



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Determinación de polifenoles, actividad antioxidante,  
antielastasa, anticolagenasa y elaboración de una  
fórmula dermocosmética a partir del extracto  
hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y  
Bioquímica

**AUTOR**

José Edwin Adalberto RODRÍGUEZ LICHTENHELDT

**ASESOR**

Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

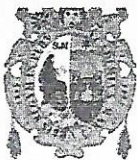
Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rodríguez J. Determinación de polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y elaboración de una fórmula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

Siendo las **08:30 hrs. del 21 de noviembre de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza e integrado por los siguientes miembros: Dr. Américo Jorge Castro Luna (Asesor), Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre, Dr. Eduardo Flores Juárez, y la Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTELASTASA, ANTICOLAGENASA Y ELABORACIÓN DE UNA FÓRMULA DERMOCOSMÉTICA A PARTIR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Eisenia cokeri* M.A. Howe"**, presentado por el Magíster en Ciencia de los Alimentos **JOSÉ EDWIN ADALBERTO RODRÍGUEZ LICHTENHELDT**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

*excelente (19)*

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Ciencia de los Alimentos **JOSÉ EDWIN ADALBERTO RODRÍGUEZ LICHTENHELDT**, el Grado Académico de Doctor en **Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las **10** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **10:10** hrs. del 21 de noviembre de 2017.

*M. Elizabeth Gonzáles L.*  
Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza (P.P., D.E.)  
Presidenta

*[Firma]*  
Dr. Américo Jorge Castro Luna (P.P. D.E.)  
Miembro - Asesor

*[Firma]*  
Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre (P.P. T.C.)  
Miembro

*[Firma]*  
Dr. Eduardo Flores Juárez (P.P. T.C.)  
Miembro

*[Firma]*  
Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (F. Aux. T.C.)  
Miembro

Observaciones:

## INDICE GENERAL

|  | Página   |
|--|----------|
| Lista de tablas                                |          |
| Lista de figuras                               |          |
| Glosario de términos                           |          |
| Resumen  |          |
| Summary  |          |
| Resumo   |          |
| <b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b>                | <b>1</b> |
| <b>CAPÍTULO II: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> | <b>2</b> |
| <i>2.1. Situación problemática</i>             | <i>2</i> |
| <i>2.2. Formulación del problema</i>           | <i>3</i> |
| <i>2.3. Justificación teórica</i>              | <i>3</i> |
| <i>2.4. Justificación práctica</i>             | <i>4</i> |
| <i>2.5. Objetivos</i>                          | <i>4</i> |
| <i>2.5.1 Objetivo general</i>                  | <i>4</i> |
| <i>2.5.2. Objetivos específicos</i>            | <i>4</i> |
| <i>2.6. Pruebas de hipótesis</i>               | <i>4</i> |
| <i>2.6.1. Hipótesis Específicas</i>            | <i>5</i> |
| <i>2.7. Identificación de las variables</i>    | <i>5</i> |
| <b>CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO</b>             |          |
| <i>3.1. Marco filosófico o epistemológico</i>  | <i>6</i> |
| <i>3.2. Antecedentes de la investigación.</i>  | <i>6</i> |
| <i>3.3. Bases teóricas</i>                     | <i>7</i> |
| <i>3.4. Aspectos botánicos</i>                 | <i>7</i> |

## **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA**

|   |           |
|---|-----------|
| <i>4.1. Materiales y Métodos</i>                                  | <i>17</i> |
| <i>4.2. Tipo y diseño de la investigación</i>                     | <i>17</i> |
| <i>4.3. Colecta del material biológico</i>                        | <i>18</i> |
| <i>4.4. Clasificación taxonómica</i>                              | <i>19</i> |
| <i>4.5. Tratamiento de la muestra</i>                             | <i>19</i> |
| <i>4.6. Preparación del extracto</i>                              | <i>19</i> |
| <i>4.7. Marcha fitoquímica</i>                                    | <i>20</i> |
| <i>4.8. Determinación de polifenoles totales.</i>                 |           |
| <i>Método de Folin-Ciocalteu</i>                                  | <i>20</i> |
| <i>4.9. Determinación de la actividad antioxidante</i>            | <i>21</i> |
| <i>4.9.1. Método de captación del</i>                             |           |
| <i>radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>                | <i>21</i> |
| <i>4.9.2. Método de captación del radical</i>                     |           |
| <i>ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín) –</i>                |           |
| <i>6-sulfónico (ABTS.+ )</i>                                      | <i>21</i> |
| <i>4.10. Determinación de la actividad antielastasa</i>           | <i>22</i> |
| <i>4.11. Determinación de la actividad anticolagenasa</i>         | <i>23</i> |
| <i>4.12. Elaboración del producto dermocosmético</i>              | <i>23</i> |
| <i>4.13. Actividad fotoprotectora del producto dermocosmético</i> | <i>24</i> |

## **CAPÍTULO V: RESULTADOS**

|  |           |
|--|-----------|
| <i>5.1.- Análisis, interpretación y discusión de resultados.</i> | <i>26</i> |
| <i>5.1.1. Extracción y rendimiento</i>                           | <i>26</i> |
| <i>5.1.2. Marcha fitoquímica</i>                                 | <i>26</i> |

|   |    |
|---|----|
| 5.1.3. Determinación de polifenoles totales.                |    |
| <i>Método de Folin-Ciocalteu</i>                            | 27 |
| 5.1.4. Determinación de la actividad antioxidante           | 27 |
| 5.1.5. Determinación de la actividad antielastasa           | 32 |
| 5.1.6. Determinación de la actividad anticolagenasa         | 34 |
| 5.1.7. Elaboración de la crema dermocosmética               | 36 |
| 5.1.8. Actividad fotoprotectora del producto dermocosmético | 36 |
| <br>  |    |
| <b>CAPITULO VI: DISCUSIÓN</b>                               | 38 |
| <b>CAPITULO VII: CONCLUSIONES</b>                           | 46 |
| <b>CAPITULO VIII : REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>           | 47 |
| <b>CAPITULO IX: ANEXOS</b>                                  | 54 |

## Lista de Tablas

**Tabla 1.** Preparación de tubos de reacción para la determinación de Polifenoles Totales

**Tabla 2.** Preparación de tubos de reacción para el método de captación del DPPH

**Tabla 3.** Preparación de tubos de reacción para el método de captación de ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 4.** Procedimiento para la determinación de la actividad antielastasa del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe

**Tabla 5.** Determinación de la actividad anticolagenasa del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri*. M.A. Howe

**Tabla 6.** Composición del producto dermocosmético

**Tabla 7.** Distribución de las muestras para la evaluación del efecto fotoprotector

**Tabla 8.** Porcentaje de rendimiento de la muestra húmeda y muestra seca.

**Tabla 9.** Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri*. M.A. Howe

**Tabla 10.** Contenido de polifenoles totales de cada una de las partes de los extractos hidroalcohólicos de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe

**Tabla 11.** Porcentaje de inhibición de DPPH del estándar Trolox®

**Tabla 12.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe según el método de DPPH

**Tabla 13.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del estípite de *Eisenia cokeri* M.A. Howe según el método de DPPH.



**Tabla 14.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico de la fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe según el método de DPPH

**Tabla 15.** Concentracion Inhibitoria 50 de los extractos hidroalcohólicos de las tres partes, rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe con relacion al estándar de referencia Trolox® según el método de DPPH

**Tabla 16.** Porcentaje de inhibicion de ABTS del estándar Trolox®

**Tabla 17.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. Según el método de ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 18.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del estípite de *Eisenia cokeri* M.A. Howe según el método de ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 19.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico de la fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe según el método de ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 20.** Concentracion Inhibitoria 50 de los extractos hidroalcohólicos de las tres partes, rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe con relacion al estándar de referencia Trolox® según el método de ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 21.** Inhibición de la actividad de la enzima elastasa: patrón de referencia galato de epigallocatequina (EGCG)

**Tabla 22.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico del rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

**Tabla 23.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico del estípite de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

**Tabla 24.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico de fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

**Tabla 25.** Porcentaje de inhibición de enzima elastasa del extracto galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri*. Howe.

**Tabla 26.** Porcentaje de inhibición de la enzima collagenasa del EGCG.

**Tabla 27.** Porcentaje de inhibición de la enzima collagenasa del extracto hidroalcohólico de rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

**Tabla 28.** Porcentaje de inhibición de la enzima collagenasa del extracto hidroalcohólico de estípite de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

**Tabla 29.** Porcentaje de inhibición de la enzima collagenasa del extracto hidroalcohólico de fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

**Tabla 30.** Porcentaje de inhibición de enzima collagenasa del extracto galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri*. Howe.

**Tabla 31.** Efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de estípite de *Eisenia cokeri*. M.A.Howe, vehiculizado en una forma dermocosmética sobre la piel depilada de *Mus musculus* hembra irradiado con luz UVB cada 12 horas durante 7 días.

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.** Biosíntesis de los compuestos fenólicos.

**Figura 2.** Secuestro de EAO (R) por los polifenoles.

**Figura 3.** Flujograma de la investigación.

**Figura 4.** Flujograma de la obtención del extracto hidroalcohólico

## **GLOSARIO DE TERMINOS**

Polifenoles: son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula.

DPPH<sup>•+</sup>: radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

ABTS<sup>•+</sup>: ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico

ROS: especies reactivas de oxígeno

MEC: matriz extracelular

PPE: elastasa pancreática porcina

HNE: elastasa de neutrófilos humana

PGG: pentagaloil glucosa

LDL: lipoproteínas de baja densidad

EGCG: epigallocatequina galato

COMT: catecol O-metil transferasa

AA: ácido araquidónico

PGE2: prostaglandina E2

iNOS: oxido nítrico sintasa inducida

COX: ciclooxigenasa

SOD9: superoxidasas dismutasa

APX: ascorbato peroxidase

DHAR: dehidroascorbato reductasa

MDHA: monodehidroascorbato

GAG's: glicosaminoglicanos

IC50: concentración de inhibición de la mediana

## RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el contenido de polifenoles totales, la actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, además de la acción fotoprotectora en una crema dermocosmética a partir de los extractos de rizoide, estípite y fronda del alga *Eisenia cokeri* M.A. Howe, mediante métodos de referencia espectrofotométricos. El contenido de polifenoles de las algas se determinó por el método de Folin-Ciocalteu a partir del material de referencia ácido gálico y la actividad antioxidante referida a los radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de polifenoles totales es de 3,11346 mg para el estípite; 0,4625 mg para la fronda y 2,31665 mg para el rizoide en ácido gálico/ gramo de muestra. Para la actividad antioxidante los extractos mostraron actividad antioxidante por los métodos de DPPH para el rizoide IC<sub>50</sub>= 65,974 µg/mL; para la fronda IC<sub>50</sub>= 280,00 µg/mL y para el estípite IC<sub>50</sub>= 248,50 µg/mL. Por el método de ABTS<sup>+</sup> los extractos mostraron para el rizoide IC<sub>50</sub>= 20,3 µg/mL; para la fronda IC<sub>50</sub>= 39,2 µg/mL y para el estípite IC<sub>50</sub>= 24,7 µg/mL. Los resultados obtenidos manifiestan que el contenido de polifenoles se relaciona muy bien con la actividad antioxidante mostrada por las muestras estudiadas. Para la actividad antielastasa, los extractos mostraron una actividad por el método de Thring para la inhibición de enzima elastasa de galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos; estos mostraron para la sustancia patrón EGCG un IC<sub>50</sub> igual a 12 µg/mL y para los extractos de rizoide 6,7; estípite 47 788 y fronda 9 607 µg/mL, respectivamente. Con relación al porcentaje de inhibición de enzima colagenasa de galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos; estos mostraron los siguientes resultados: para el rizoide 83,60; estípite 106,281 y para fronda 113,87 µg/mL; siendo para el EGCG 216,991 µg/mL. Se realizó la prueba del efecto fotoprotector del extracto de rizoide, presentando las mejores condiciones en contenido de polifenoles, efecto antioxidante, antielastasa y anticolagenasa. De las cremas elaboradas al 1,3, y 5% con el extracto, la que más se aproxima a las características de uso de la crema comercial, usado como referencia; es la crema al 5%; concluyéndose que con este extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe y que se puede elaborar una crema dermocosmética con éste extracto.

Palabras clave: *Eisenia cokeri* M.A. Howe, polifenoles, actividad antioxidante, actividad antielastasa, actividad anticolagenasa, efecto fotoprotector.

## SUMMARY

This research aimed to evaluate the content of total polyphenols, antioxidant activity, antielastase, anticollagenase, in addition to the photoprotective action in a dermocosmetic cream from the extracts of rhizoid, stipe and frond of *Eisenia cokeri* M.A. Howe, using spectrophotometric reference methods. The polyphenol content of the algae was determined by the method of Folin-Ciocalteu from the gallic acid reference material and the antioxidant activity referred to the free radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and acid 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS. +. The results obtained showed that the content of total polyphenols is 3.111346 mg for the stipe; 0,4625 mg for the frond and 2,31665 mg for the rhizoid in gallic acid / gram of sample. For the antioxidant activity the extracts showed antioxidant activity by the DPPH methods for the IC<sub>50</sub> rhizoid = 65,974 µg / mL; for the frond IC<sub>50</sub> = 280,00 µg / mL and for the IC<sub>50</sub> sperm = 248,50 µg / mL. By the ABTS method + extracts showed for rhizoid IC<sub>50</sub> = 20,3 µg / mL; for the frond IC<sub>50</sub> = 39,2 µg / mL and for the IC<sub>50</sub> sternite = 24,7 µg / mL. The obtained results show that the content of polyphenols correlates very well with the antioxidant activity shown by the samples studied. For the antielastase activity, the extracts showed an activity by the Thring method for the inhibition of epigallocatechin gallate elastase enzyme (EGCG) and hydroalcoholic extracts; these showed for the standard substance EGCG an IC<sub>50</sub> equal to 12 µg / mL and for the rhizoid extracts 6,7; stipe 47 788 and frond 9 607 µg / mL, respectively. Regarding the percentage inhibition of epigallocatechin gallate collagenase enzyme (EGCG) and hydroalcoholic extracts; these showed the following results: for the rhizoid 83,60; sperm 106,281 and for frond 113,87 µg / mL; being for EGCG 216,991 µg / mL. The photoprotective effect of the rhizoid extract was tested, presenting the best conditions in polyphenol content, antioxidant effect, antielastase and anticollagenase. Of the creams made at 1, 3, and 5% with the extract, which most closely matches the characteristics of the commercial cream, used as a reference; is 5% cream; it being concluded that this hydroalcoholic extract of *Eisenia cokeri* M.A. Howe and that you can make a dermocosmetic cream with this extract.

Keywords: *Eisenia cokeri* M.A. Howe, polyphenols, antioxidant activity, antielastase activity, anti-collagenase activity, photoprotective effect.

## RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o conteúdo de polifenóis totais, atividade antioxidante, anti-elastase, anti-colagenase, assim como a ação fotorresiste em um dermo creme de extratos rizoide, estipe e algas frond *Eisenia cokeri* M.A. Howe, usando métodos de referência espectrofotométrica. O teor em polifenol de algas foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu do material de referência de ácido gálico e atividade antioxidante refere-se a radicais livres de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS +. Os resultados obtidos mostraram que o teor de polifenóis totais é de 3,111346 mg para o stipe; 0,4625 mg para frond e 2,31665 mg para o rizóide em ácido gálico / grama de amostra. Para a atividade antioxidante, os extratos mostraram atividade antioxidante pelos métodos DPPH para o rizóide IC50 = 65,974 µg / mL; para o frond IC50 = 280,00 µg / mL e para o esperma IC50 = 248,50 µg / mL. Pelo método ABTS + extratos mostrados para IC50 de rizóide = 20,3 µg / mL; para o frond IC50 = 39,2 µg / mL e para a esternite IC50 = 24,7 µg / mL. Os resultados mostram que o conteúdo de polifenóis se correlaciona muito bem com a atividade antioxidante mostrada pelas amostras estudadas. Para a atividade antielastase, os extratos mostraram uma atividade pelo método de Thring para a inibição da enzima de elastase de galato de epigallocatequina (EGCG) e extratos hidroalcoólicos; estes mostraram para a substância padrão EGCG um IC50 igual a 12 µg / mL e para os extratos de rizóides 6,7; stipe 47 788 e frond 9 607 µg / mL, respectivamente. Em relação à percentagem de inibição da enzima colagenase de galato de epigallocatequina (EGCG) e extratos hidroalcoólicos; Estes mostraram os seguintes resultados: para o rhizoid 83,60; esperma 106,281 e frond 113,87 µg / mL; sendo para EGCG 216,991 µg / mL. O efeito fotoprotetor do extrato de rizóide foi testado, apresentando as melhores condições em teor de polifenóis, efeito antioxidante, antielastase e anticolagenasa. Das cremes feitas a 1, 3, e 5% com o extrato, que corresponde mais às características do creme comercial, utilizado como referência; é 5% de creme; conclui-se que este extrato hidroalcoólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe e que você pode fazer um creme dermocosmético com este extrato.

Palavras-chave: *Eisenia cokeri* M.A. Howe, polifenóis, atividade antioxidante, atividade antielastase, atividade anti-colagenase, efeito fotoprotetor.

## ***AGRADECIMIENTOS***

Mi respetable consideración y agradecimiento al Asesor de la Tesis: Dr. Américo Castro Luna; maestro y guía que con sus aportes hicieron realidad este trabajo de investigación.

A mi padre Sr. Dr. José Raúl Rodríguez Ordoñez; que no está con nosotros; ya que con sus enseñanzas no hubiese sido posible que todos nosotros sus hijos seamos profesionales.

A mi madre y hermanos, inmenso apoyo y agradecimiento total.

A aquella persona especial que dio un rumbo distinto a mi vida, este trabajo dedicado.



## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los organismos marinos, incluidas las algas, han atraído la atención de muchos investigadores como fuentes de compuestos biológicamente activos; sus propiedades biológicas, la diversidad de sus moléculas muchas con estructuras químicas complejas y novedosas que resultan difíciles de sintetizar así como el número de moléculas con efectos similares o sinérgicos en un organismo determinado son aspectos que refuerzan esta tendencia.

En los mares tropicales, las algas marinas están expuestas a una alta incidencia de luz solar que pudieran conducir a la formación de radicales libres, de manera que la ausencia de daños oxidativos en sus componentes estructurales y fisiológicos sugieren que estos organismos presentan un eficiente sistema de defensa antioxidante (Vidal, 2009).

En Perú, existen muchas especies de algas marinas, entre éstas *Eisenia cokeri* M.A. Howe, que como un organismos marino, están expuestas a una serie de combinaciones de luz y altas concentraciones de oxígeno, que permite la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes (Copia, 2012).

Las algas pardas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales incluyen terpenoides, florotaninos, hidrocarburos volátiles y productos de origen biogénico mixto con actividad antioxidante y como inhibidores de diferentes enzimas (Chanchal, 2009).

Por lo que se toma como objetivo de la presente tesis, demostrar *in vitro* e *in vivo* la actividad fotoprotectora contra la radiación UV de los extractos hidroalcohólicos de *Eisenia cokeri* M.A. Howe sobre la piel; siendo esta una especie no investigada en nuestro país.

## **CAPITULO II: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### ***2.1. Situación problemática***

Los factores, como la herencia y los daños causados por los rayos ultravioleta del sol tienen una influencia significativa en el proceso de envejecimiento. Dado que la dieta juega un papel importante en la piel humana, el primer paso para superar problemas del envejecimiento es hacer cambios en la dieta. La clave para mantener un brillo de juventud es una dedicación de por vida al estilo de vida saludable y constante cuidado de la piel. El hecho es que los tratamientos de belleza relacionados con la piel no ayudarán si un estilo de vida saludable no se mantiene. El envejecimiento de la piel puede ser inevitable. Pero hay algunos consejos naturales del cuidado de la piel para disminuir las arrugas o evitar la piel flácida. Un tratamiento común es el uso de cremas para la piel. Puede ser una parte del régimen diario, pero la mejor manera de empezar una lucha contra el envejecimiento es del interior de nuestro cuerpo.

Los efectos dañinos de la radiación solar sobre la piel son causados principalmente por la radiación ultravioleta, la cual se divide en la región UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) y UV-C (200-290 nm). La radiación UV-C es filtrada por la atmósfera antes de llegar a la tierra; la UV-B no es completamente filtrada por la capa de ozono y es causante principalmente del eritema en piel y la UV-A llega hasta capas profundas de la dermis provocando el fotoenvejecimiento de la piel. La exposición de la piel a la luz solar genera la liberación de citoquinas pro-inflamatorias e inmunosupresoras. Asimismo, produce especies reactivas de oxígeno, las cuales reaccionan con el ADN, proteínas, ácidos grasos, causando envejecimiento prematuro de la piel caracterizado por híper/hipo pigmentación de la piel, pérdida de elasticidad, arrugas y riesgo de cáncer a la piel. En los últimos años se ha despertado en la población un gran interés por usar productos naturales botánicos para prevenir el daño inducido por la radiación UV. En tal sentido, las plantas más promisorias para prevenir los daños causados por la radiación solar son aquellas que posean actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y antioxidante

Las radiaciones ultravioleta dañan las fibras colágenas y elásticas, los fibroblastos, las células inmunes cutáneas, la microvasculatura y diferentes tipos celulares del estrato epidérmico (Rojas, 2013).

La piel es un tegumento que cumple la función protectora, intercambio acuoso y térmico con el medio externo y sintetiza la vitamina D, es por ello que su mantenimiento es importante para el organismo, asimismo sufre el proceso de envejecimiento, intrínseca y extrínseco, siendo

dañino para ella la radiación ultravioleta. El déficit de agua en la piel genera un apariencia seca, arrugada y escamosa, este impedimento del paso del agua transepidermica genera alteraciones como la acantosis e hiperqueratosis entre otros daños (Doroteo, 2012).

Estudios morfológicos realizados por diferentes autores, han demostrado que bajo la influencia de la luz UV se destruye el colágeno y aumenta el número de las fibras elásticas (Rojas, 2013).

## **2.2. Formulación del problema**

El extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M. A. Howe contiene polifenoles, posee actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, y a partir del extracto se puede elaborar una fórmula dermocosmética?

## **2.3.- Justificación teórica**

Se indica que por causa del estrés oxidativo a que se encuentran sometidas constantemente, las algas marinas son organismos que presentan en su composición química cantidades apreciables de compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran compuestos lipofílicos como ácidos grasos insaturados, clorofila y carotenos; compuestos hidrofílicos como polifenoles y vitamina C; y polisacáridos. Muchos autores han comprobado que los extractos de algas marinas presentan actividad antioxidante explicada por varios mecanismos de acción; entre estos se encuentran las capacidades atrapadoras de radicales libres, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica. Adicionalmente se ha comprobado que extractos de vegetales, con compuestos químicos también presentes en las algas, son capaces de inducir enzimas relacionadas con la inactivación de las especies reactivas de oxígeno (ERO). La actividad antioxidante de un extracto vegetal, incluidas las algas marinas, puede ser explicada por la presencia de disímiles compuestos químicos. Las algas marinas pudieran tener compuestos apolares, como los derivados clorofílicos, terpenoides y carotenoides. Algunas especies de algas (y otros organismos marinos) tienen aminoácidos tipo micosporinas, capaces de absorber cantidades apreciables de radiaciones UV y evitar así el daño peroxidativo. El contenido de vitaminas liposolubles como vitamina E; hidrosolubles como vitamina C, compuestos que presentan actividad antioxidante, también pudieran contribuir a las propiedades antioxidantes de estos organismos (Batista, 2009).

Las algas pardas son un grupo de especies vegetales, poseen polifenoles que son antioxidantes activos, abundantes, principalmente en tejidos vegetales. Estos antioxidantes corresponden a un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos, sustituidos por funciones hidroxílicas (Ortiz, 2011).

El problema reside en que no se ha encontrado trabajos de investigación realizados sobre esta especie *Eisenia cokeri* M.A. Howe; relacionados a su composición química, actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos; actividades antielastasa; anticolagenasa y fotoprotectora; justificándose esta investigación al ser una especie existente en nuestro litoral.

## **2.4. Justificación práctica**

Se hará la evaluación de los polifenoles, la actividad antioxidante, actividad antielastasa, anticolagenasa *in vitro*, y la elaboración de una fórmula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe

## **2.5.- OBJETIVOS**

### **2.5.1 Objetivo general**

Demostrar *in vitro* e *in vivo* la actividad fotoprotectora contra la radiación UV de los extractos hidroalcohólicos de *Eisenia cokeri* M.A. Howe sobre la piel.

### **2.5.2. Objetivos específicos**

- 1) Determinar la presencia de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe
- 2) Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe por los métodos de DPPH y ABTS<sup>•+</sup>
- 3) Calcular la actividad antielastasa y anticolagenasa *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.
- 4) Elaborar una fórmula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.
- 5) Evaluar la actividad fotoprotectora *in vivo* de la fórmula dermocosmética conteniendo extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

## **2.6. Pruebas de hipótesis**

### **2.6.1. Hipótesis general**

El extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe posee polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, fotoprotectora, y se elaborará una formula dermocosmética.

### **2.6.2. Hipótesis Específicas**

El extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe posee polifenoles.

El extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe posee actividad antioxidante.

El extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe contiene actividad antielastasa y actividad anticolagenasa.

A partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe se podrá elaborar una formula dermocosmetica.

De esta fórmula dermocosmetica se evaluara los parámetros organolépticos y su contenido de actividad fotoprotectora *in vivo*.

## **2.7. Identificación de las variables**

a) Variable independiente: extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* var. M.A. Howe

Fórmula dermocosmética.

b) Variables dependientes:

Actividad antioxidante.

Actividad antielastasa.

Actividad anticolagenasa.

Fórmula dermocosmética.

Análisis organoléptico.

Actividad antioxidante

## CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO

### 3.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Desde la antigüedad, el estudio de los vegetales se ha abordado con dos aproximaciones bastante diferentes: la teórica y la utilitaria. Desde el primer punto de vista, al que se denomina botánica pura, la ciencia de las plantas se erigió por sus propios méritos como una parte integral de la biología. Desde una concepción utilitaria, por otro lado, la denominada botánica aplicada era concebida como una disciplina subsidiaria de la medicina o de la agronomía. En los diferentes períodos de su evolución una u otra aproximación ha predominado, si bien en sus orígenes —que datan del siglo VIII a. C. — la aproximación aplicada fue la preponderante (Arber, A. 1989).

La botánica, como muchas otras ciencias, alcanzó la primera expresión definida de sus principios y problemas en la Grecia clásica y, posteriormente, continuó su desarrollo durante la época del Imperio romano. Teofrasto, discípulo de Aristóteles y considerado el padre de la botánica, legó dos obras importantes que se suelen señalar como el origen de esta ciencia: *De historia plantarum* (Historia de las plantas) y *De causis plantarum* (Sobre las causas de las plantas). Los romanos contribuyeron poco a los fundamentos de la botánica, pero hicieron una gran contribución a nuestro conocimiento de la botánica aplicada a la agricultura. El enciclopedista romano Plinio el Viejo aborda las plantas en los libros 12 a 26 de sus 37 volúmenes de *Naturalis Historia* (Ogilvie, B. W. 2003).

Por lo que la filosofía está ligado íntimamente a la botánica, parte de nuestra investigación, por lo que la filosofía es el inicio de toda investigación científica.

### 3.2. Antecedentes de la investigación

Los estudios sobre las macroalgas del litoral peruano son aun escasos, y la mayoría de ellos están enfocados la clasificación taxonómica; se indica que la diversidad, taxonomía y ecología de las *Phaeophyceae* (algas pardas) en el litoral peruano (3° 25' LS; 18° 20' LS) fueron determinadas, en base a colecciones efectuadas desde 1980 a 1994 y de la revisión de especímenes catalogados en los Herbarios de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT) y Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) dan a *Eisenia cokeri* una macroalga que se encuentra en todo el litoral peruano (Alvitez Izquierdo, 2007).

Un estudio acerca de las flora actual de la cuenca baja del río Supe y sus evidencias arqueológicas en el sitio Caral; en la que describe en el

sitio pre cerámico Los Gavilanes en Huarmey, entre los 3000 y 1800 años a.C. a las especies de las algas *Macrocystis pyrifera* y *Eisenia cokeri* M.A. Howe (Portocarrero, 2007).

Se estudia la actividad antioxidante de dos especies de algas marinas (*H. opuntia* y *H. monile*) mediante el ensayo de atrapamiento de radicales DPPH<sup>•</sup> y el sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico, se les determinó el contenido en fenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu con resultados de los ensayos utilizados se obtuvieron valores altos de actividad antioxidante para las diferentes fracciones y la presencia de los ácidos fenólicos y cinámicos (Vidal A, 2009).

Además en este mismo rubro de investigación se estudió los compuestos fenólicos, y actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara) (Doroteo, 2012).

Un estudio realizó la actividad antioxidante, anti-elastasa, anti-colagenasa de los extractos hidroalcohólicos de dos recursos vegetales en el Perú: la *Bixa orellana* (achiote) y *Oenothera rosea* (chupasangre) mostraron buena actividad antioxidante e inhiben moderadamente la enzima elastasa y altamente la enzima colagenasa (Rojas 2013). Asimismo se ha evaluado la actividad antioxidante y antienzimática in vitro y antiinflamatoria in vivo del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* “tara” (Nuñez & Quispe, 2015).

Un estudio que investiga la presencia de polifenoles, las actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y el efecto fotoprotector de otra alga *Leissonia nigrescens* Bory y desarrolla una fórmula dermatocósmica concluye que esta alga demuestra presencia antioxidante, actividad antielastasa, actividad anticolagenasa, y la crema preparada con el extracto hidroalcohólico demostró efecto fotoprotector (Giurfa & Oblitas, 2017).

### **3.3. Bases teóricas**

#### **3.3.1. Aspectos botánicos**

##### **(1) Clasificación botánica**

Según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017 se tiene lo siguiente:

|                   |               |
|-------------------|---------------|
| <b>División:</b>  | Ochrophyta.   |
| <b>Clase:</b>     | Phaeophyceae. |
| <b>Sub Clase:</b> | Fucophycidae. |
| <b>Orden:</b>     | Laminariales. |
| <b>Familia:</b>   | Lessoniaceae. |

**Género:** *Eisenia*.  
**Especie:** *Eisenia cokeri*. M. A. Howe.

## **(2) Descripción morfológica**

Plantas gregarias, alcanzan hasta 1.70 metros de altura, el talo está previsto de un rizoides fuertemente compacto, hapteroides, discoidal de 4-20 cm de diámetro; estípite hasta de 80 cm de longitud en la madurez, sólido compresado-cilíndrico de 1.3-2,5 cm de diámetro en la base, en la parte distal es notoriamente aplanado, sólido; las láminas en las plantas jóvenes son oblongas o ampliamente lineares, de 20-30 cm de longitud, lisa en la parte inferior y longitudinalmente rugosa en la parte superior, con 6 u 8 pinnas en cada margen, más abundantes en la zona de transición o límite con el estípite que es cóncavo-convexo; la lámina primaria es reemplazada posteriormente por dos ramas, retorcidas, que terminan en una expansión semiarrugada y torcida que lleva los abundantes esporófilos lineares, de 3-5 cm de ancho por más de 80 cm de longitud, de base larga cuneada, simple o furcada, o raras veces con 1 ó dos ramas laterales cortas, más gruesas cerca la base que en la parte distal, superficie de la lámina con rugosidades longitudinales muy notorias, de borde aserrado, lleva una serie de dientes submarginales, de diversa longitud algunas alcanzan hasta 5 cm, otras veces sin apéndices, el diente marginal más grande lleva uno ó dos dientes pequeños (Acleto, 1986).

## **(3) Distribución geográfica y hábitat**

El área de distribución de esta especie en el litoral peruano abarca la zona central Isla Vieja, Ica, hasta Máncora y Tumbes, en la zona norte. Se ha registrado en las siguientes localidades.

Ica: Isla Vieja, Laguna Grande, Islas Chincha, Lima: Pucusana, San Bartolo, Isla San Lorenzo, Ancash: Bahía de Chimbote, Piura: Isla Lobos de Tierra, Yasila, Paíta, Máncora, Sechura (Acleto, 1986).

La especie *Eisenia cokeri* M.A. Howe tiene una distribución amplia en la costa del Océano Pacífico, en mayor cantidad en la zona Norte y Centro del Perú (Alvitez, 2007).

La ausencia o presencia de las macroalgas en los diversos sustratos es variable tal es así que en el sustrato rocoso áspero o con fisuras es más abundante mientras que en el sustrato arenoso sólo es posible cuando la arena se consolida y forma una superficie firme en los ambientes con aguas tranquilas y sin olas. Con respecto a la frecuencia porcentual de las macroalgas en las diferentes playas esta se encuentran influenciada por la calidad del



sustrato, así un hábitat rocoso genera mayor concentración de especies. Las características morfológicas del sustrato presente se traducen en superficies irregulares ideales que facilitan y permiten la fijación de esporas y propágulos de las macroalgas marinas. Aquellas playas exentas de contaminación presentan mayor diversidad y abundancia de macroalgas, lo que es generalmente aceptado como un factor importante en su distribución. Todos los factores fisicoquímicos ligados a la abundancia, presencia y ausencia de las macroalgas permiten conformar las regiones denominadas biogeográficas (Li-Alfaro, 2009).

Otras especies de algas pardas como, *Eisenia cokeri* en Perú, han sido consideradas como recursos potenciales, para la industria de alginatos, en función de sus biomásas locales (Vásquez, 2017).

#### **(4) Extracto hidroalcohólico**

Los extractos fluidos son preparados usando etanol de concentración adecuada o agua para extraer, los componentes solubles de la droga vegetal o tejido animal, o por dilución de un extracto denso o seco de la droga vegetal o animal (el cual haya sido producido usando el mismo solvente con el mismo porcentaje o grado durante el proceso de extracción directa o preparación del extracto líquido). Los extractos fluidos pueden ser filtrados, si fuera necesario. Puede estar presente un ligero sedimento el cual es aceptable en dependencia de que la composición del extracto fluido no cambie significativamente (Valdez, 2008).

#### **(5) Compuestos polifenólicos**

Los polifenoles son antioxidantes activos, abundantes, principalmente, en tejidos vegetales. Estos antioxidantes corresponden a un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos, sustituidos por funciones hidroxílicas (Ortiz, 2011).

Las algas también contienen polifenoles, compuestos bioactivos con alta capacidad antioxidante y también con actividad biológica específica que afecta la expresión de genes. Existe gran interés científico por las propiedades de los polifenoles en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Las algas pardas contienen concentraciones más altas de polifenoles que algas rojas y verdes. La pared celular de las algas presenta una complejidad estructural y rigidez, está compuesta de una mezcla de polisacáridos ramificados y azufrados que se encuentran asociados con proteínas y iones, como calcio y potasio, lo que constituye el mayor obstáculo para la eficiente extracción de los constituyentes bioactivos intracelulares,

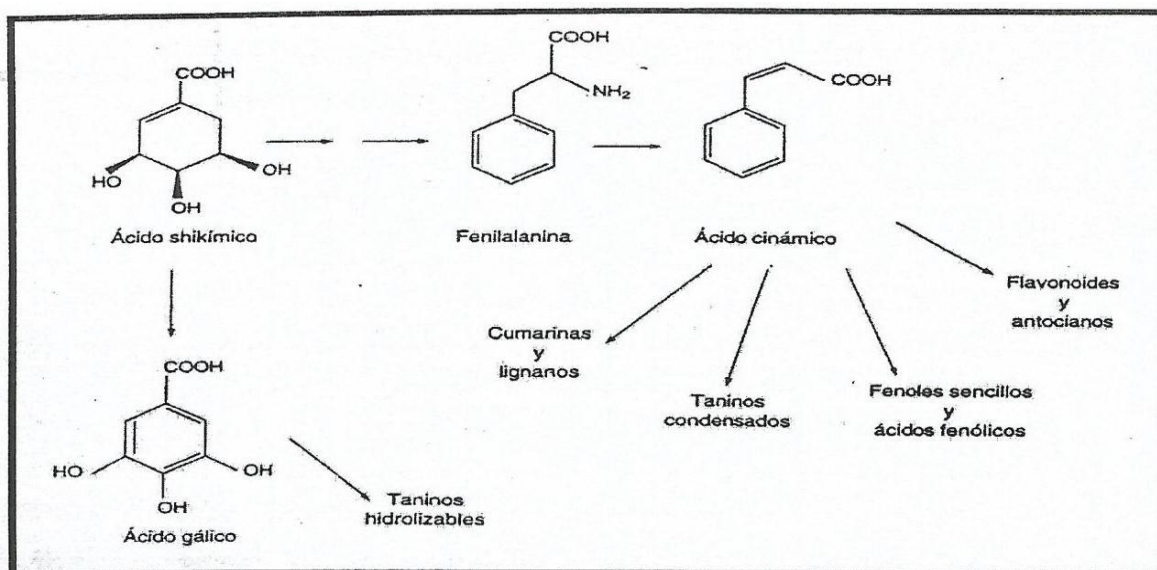
para la determinación de polifenoles se debe recurrir a ensayos con diferentes solventes y tratamiento enzimático para una eficiente extracción (Quitral, 2012).

Los compuestos polifenólicos son compuestos químicos sintetizados por las plantas como producto de su metabolismo secundario. Son un conjunto heterogéneo de moléculas que se caracterizan por la presencia de uno o más anillos fenólicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales (asimilación de nutrientes, síntesis proteica, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, etc.) mientras que otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Giurfa, 2017).

#### ***(6) Origen y estructura de los compuestos polifenólicos***

Los compuestos polifenólicos constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular como los taninos hidrolizables y condensados (Tomas, 2003).

Se refieren a un grupo de compuestos químicos, que poseen anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, frecuentemente como glucósidos. Relativamente polares, tienden a ser solubles en agua, pudiendo ser detectados por el color verde, púrpura, azul o negro que producen cuando se le agrega solución acuosa al 1% de cloruro férrico. Dada la naturaleza aromática de estos compuestos fenólicos, muestra intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo. (Martínez, 2002) . La biosíntesis se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Biosíntesis de los compuestos fenólicos. (Kuklinski, 2003)

### **(7) Actividad biológica de los polifenoles**

Presentan propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante. El grado de actividad antioxidante de los distintos compuestos depende de la estructura individual y el número de oxidrilos sustituyente, así como del peso molecular. La actividad antioxidante de los polifenoles es el origen de sus funciones biológicas como antienvjecimiento, anticancerígeno, antiinflamatorio, vasodilatador, antitrombotico y prevención de las enfermedades cardiovasculares (Quiñones, 2012).

Se ha documentado que el proceso de síntesis y excreción de compuestos polifenólicos en algas marinas es un mecanismo de defensa contra el herbivorismo y niveles altos de radiación UV. La concentración de florotaninos en el alga *Lessonia nigrescens*, por ejemplo, aumenta según incrementa el nivel de radiación UV (Abdala-Díaz, 2014).

### **(8) Actividad antioxidante**

Se evalúa la capacidad antioxidante de diferentes polifenoles encontrando que comparado con los antioxidantes fisiológicamente activos (glutatión,  $\alpha$ -tocoferol, ergotioneina) y los sintéticos (trolox, BHT, BHA). Las investigaciones indican que los polifenoles pueden tener capacidad antioxidante con potenciales beneficios para la salud. Podrían reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer. Otra ventaja de sus propiedades antioxidante es por su contenido de silicona, que se cree que ayuda a prevenir la flacidez. En los balnearios, el alga se utiliza a menudo

como tratamientos corporales para reforzar temporalmente la piel (Rojas, 2010).

Diversos autores han demostrado que la fucoxantina de diferentes tipos de algas tiene un efecto antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, antiobesidad, neuroprotector, fotoprotector y preventivo de osteoporosis (Quitral, 2012).

### **(9)Antioxidantes**

Son nutrientes capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. De acuerdo al modo de acción los antioxidantes se clasifican como bloqueadores de radicales libres, quelantes de iones metálicos y como eliminadores de oxígeno (Barja, 2014).

### **(10) Radicales libres**

Es una entidad química de átomo o molécula que presenta un electrón desapareado en el orbital externo y puede tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Una molécula se convierte en radical libre al perder o ganar un electrón. Son átomos por lo general de oxígeno, altamente reactivos e inestables; se les denomina más propiamente “especies reactivas de oxígeno” (ERO), para diferenciarlos de las “especies reactivas de nitrógeno” (ERN), que comprende al óxido nítrico y al dióxido nítrico (Rodríguez, 2014).

### **(11)Antioxidantes naturales**

Entre los antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimentaria que estabilizan y protegen grasas vegetales y animales tenemos al Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Terbutil hidroquinona (TBHQ) y el Galato de propilo (PG). Entre los antioxidantes naturales encontrados en las plantas tenemos a los flavonoides, derivados del ácido cinámico, tocoferoles y ácidos orgánicos polifuncionales (Rodríguez, 2014).

### **(12)Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo/nitrosativo es descrito en la literatura como un proceso en el cual se producen especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. Es un proceso degenerativo que puede ser importante mediador del daño a estructuras celulares, incluyendo lípidos y membranas, proteínas y ADN. Sin embargo en la actualidad se viene discutiendo que a bajos y moderados niveles las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno podrían funcionar como señales moleculares que regularían una serie de procesos fisiológicos,

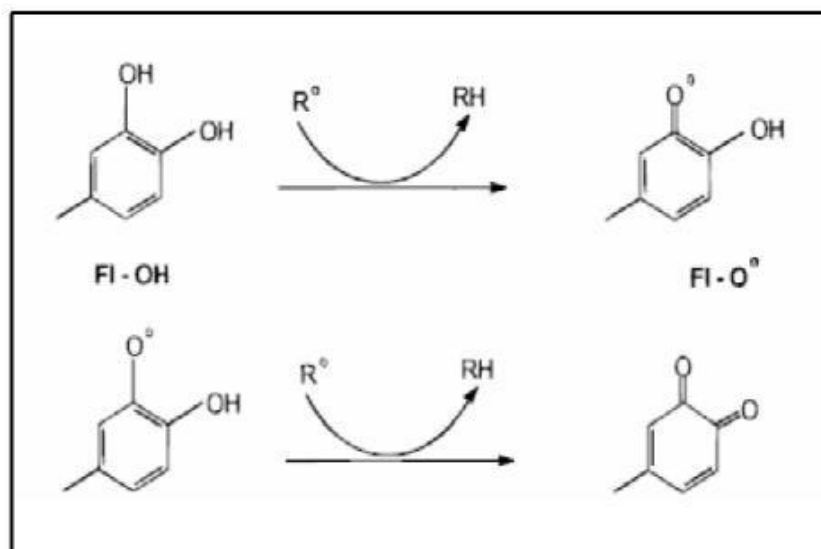
así como la defensa contra agentes infecciosos, el mantenimiento del tono vascular, el control de la ventilación, y producción de eritropoyetina y señal de transducción de los receptores de membrana en los procesos fisiológicos (Giurfa & Oblitas, 2017).

La radiación ionizante proveniente de la atmósfera o de la radioterapia es absorbida fundamentalmente por el H<sub>2</sub>O (por su abundancia), produciéndose un gran número de especies reactivas (H<sup>•</sup>, <sup>•</sup>OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) en aproximadamente 10<sup>-9</sup> segundos luego de la exposición. Las ERO provocan la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados y de los fosfolípidos de las membranas. La peroxidación lipídica (POL) conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, originando alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total. Los procesos de peroxidación conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos como los hidroperóxidos, el malonildialdehído (MDA) entre otros (Tovar, 2013).

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio de las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura - función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; siendo este el mecanismo. Figura 2 (Núñez & Quispe, 2015).

### ***(13) Mecanismo de acción de la actividad antioxidante***

***Captadores de radicales libres*** los compuestos fenólicos pueden actuar como donadores de hidrogeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicadas los radicales libres (García Alonso, 2005).



**Figura 2.** Secuestro de ERO por los polifenoles. (Núñez & Quispe. 2015)

#### **(14) Actividad antienzimática**

##### **a. Enzimas**

Son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción (Núñez & Quispe, 2015)

##### **b. Actividad antielastasa**

La enzima elastasa es una proteasa que degrada la proteína elastina, la cual es sumamente importante para darle elasticidad a las arterias, pulmones, ligamentos y piel. La actividad de la enzima elastasa aumenta con el paso de los años, especialmente en personas mayores de 40 años de edad, lo cual conlleva a la disminución de la elasticidad de la piel y aparición de arrugas.

El ensayo se llevara a cabo por el método descrito por Thring y consiste en incubar la muestra con la enzima elastasa pancreática porcina y el sustrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala- p-nitroalilide para que se inicie la reacción, usando galato de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia (Núñez & Quispe, 2015).

### ***c. Actividad anticolagenasa***

El 80% del peso seco de la piel está constituido por la proteína colágeno, la cual es responsable del tono de la piel. La enzima colagenasa se encarga de romper los enlaces peptídicos del colágeno y se estima que sustancias que inhiban dicha enzima podrían ser usados como agentes preventivos de la aparición de arrugas. El ensayo se llevara a cabo por el método descrito por Thring y consistirá en incubar la muestra con la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* y el sustrato FALGPA, para que la reacción se inicie y se utiliza galato de epigallocatequina (ECGC) como compuesto de referencia (Núñez & Quispe, 2015).

En la actualidad la actividad antielastasa y anticolagenasa se viene estudiando en diversas especies vegetales con el propósito de encontrar nuevas fuentes naturales para la prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento. La proteína elastina está presente en el tejido conectivo de la piel y los pulmones y es catalizada por la enzima elastasa, La degradación de la elastina por la elastasa intracelular, se incrementa con la edad y/o con la repetida exposición a la radiación UV, llevando al envejecimiento de la piel. (Ndlovu, 2013).

Por otra parte el colágeno, es la mayor proteína estructural de la matriz extracelular de la piel y es degradada por las metaloproteinasas de la matriz (MMP), entre las cuales se encuentra la enzima colagenasa. Después de la exposición a grandes dosis de radiación UV, se forman grandes cantidades de MMPs, lo que reduce la producción de colágeno. El envejecimiento de la piel es consecuencia de una matriz de colágeno fragmentada por los MMPs (Kohl, 2011).

## ***(15) Formulación de un producto dermocosmético***

La incidencia de cáncer de piel ha estado aumentando en las últimas décadas, pero la mayoría de las formulaciones comerciales utilizadas como filtros solares están diseñadas para proteger sólo contra el eritema solar. Muchos de los componentes activos presentes en los filtros solares muestran debilidades críticas, tales como baja estabilidad y toxicidad (Losantos, 2017).

### ***a. Envejecimiento de la piel***

El proceso de envejecimiento de la piel se ha dividido en dos categorías:

El envejecimiento intrínseco y extrínseco.

- **Envejecimiento de la piel intrínseca** o envejecimiento natural es causado por los cambios en la elasticidad de la piel con el tiempo.
- **Envejecimiento de la piel extrínseca** es predominantemente resultado de la exposición a la radiación solar (fotoenvejecimiento) cuya exposición a rayos UV causa cambios físicos en la piel debido a las alteraciones que se producen en el tejido conectivo a través de la formación de peróxidos de lípidos, contenido en células y enzimas, y especies reactivas de oxígeno (ROS).

#### ***b. Antioxidantes en dermatología***

Actualmente existen ensayos clínicos que proporcionan evidencia del beneficio de los antioxidantes (AOs) al ser aplicados de manera tópica. Consecuencia de esto, el desarrollo de productos farmacéuticos que los contienen ha crecido de modo acelerado en los últimos años, principalmente como complemento en la terapia contra el envejecimiento cutáneo. Los RL son moléculas altamente reactivas capaces de modificar las células de su entorno. Los antioxidantes (AOs) son moléculas capaces de neutralizar a los RL. La piel cuenta con un complejo y especializado sistema AOs, entre ellos Superóxido dismutasa (SOD), glutatión, ubiquinona, y las vitaminas C y E. Algunos estudios experimentales han encontrado actividad anti proliferativa/anti carcinogénica, efecto fotoprotector y anti envejecimiento al ser utilizados por vía tópica, no así por vía sistémica. La concentración de AOs y el vehículo son factores importantes en su efectividad (Castellanos, 2010).

#### ***(16) Actividad fotoprotectora***

La radiación ultravioleta (UV), tanto procedente del sol como de fuentes artificiales, es potencialmente nociva para los organismos a varios niveles. En humanos, la radiación UVB es responsable de la producción de eritema actínico, quemaduras solares y carcinogénesis, además de estar directamente relacionada con procesos de inmunosupresión mientras que la radiación UVA es la responsable del bronceado inmediato de la piel, del fotoenvejecimiento y la fotosensibilización cutánea. Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs), presentes en multitud de organismos acuáticos, son compuestos que, debido a su estructura química, son eficaces como filtros de la radiación ultravioleta entre 300 y 350 nm. Entre las distintas propiedades que se les atribuye destaca su actividad como fotoprotector y como antioxidante.

En el mercado existen muchos protectores solares que se presentan como eficaces frente a las radiaciones UVA y UVB. El problema de muchos de los filtros solares del mercado, de origen sintético, es que provocan reacciones de fotosensibilidad en algunos individuos. Los MAAs disipan térmicamente, de modo muy eficiente, la energía



absorbida procedente de la radiación UV sin producir residuos de la fotólisis de las moléculas. Todo ello, unido a la alta fotoestabilidad *in vitro* e *in vivo*, son atributos de un buen fotoprotector frente a la radiación UV (López, 2006).

El aumento de la radiación ultravioleta solar en la superficie de la tierra ha llevado al agotamiento del ozono estratosférico en las últimas décadas, acelerando así la necesidad de proteger la piel humana contra sus efectos de la radiación UV como eritema, edema, hiperpigmentación, fotoenvejecimiento y cáncer de piel. Hay muchas maneras diferentes de proteger la piel contra los efectos dañinos de la radiación UV. La forma más popular de reducir la cantidad de radiación que penetra en la piel es la aplicación tópica de productos de protección solar que contienen moléculas activas que absorben o reflejan los rayos UV. Basándose en su mecanismo de protección, las moléculas activas en los filtros solares se dividen ampliamente en agentes inorgánicos y orgánicos. Estas moléculas sintéticas tienen una concentración limitada según la preocupación de la regulación. Se han utilizado varios compuestos naturales con propiedades de absorción de UV para sustituir o reducir la cantidad de agentes de protección solar sintéticos. Además de la propiedad de absorción UV, los compuestos naturales proporcionan una protección adicional contra los efectos perjudiciales de la exposición a la radiación UV. Los compuestos derivados de fuentes naturales han ganado considerable atención para su uso en productos de protección solar y han reforzado la tendencia del mercado hacia los cosméticos naturales. Esto se suma a la importancia de que haya una amplia selección de moléculas activas en las formulaciones de filtro solar (Saewan N1, 2015).

## **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA**

### **4.1. *Materiales y Métodos***

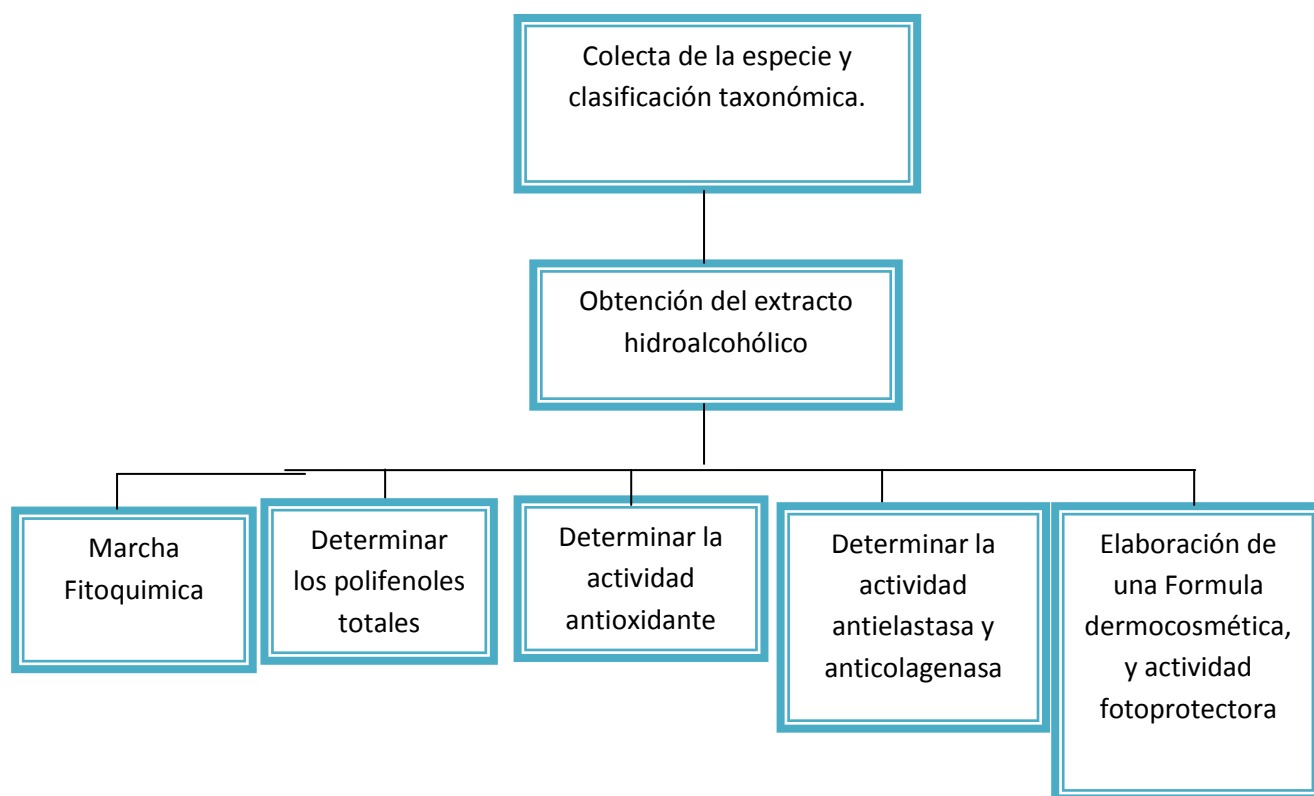
Se especifica en cada procedimiento; los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las casas Sigma, Merck, Baker y Aldrich.

### **4.2. *Tipo y diseño de la investigación***

Analítica, experimental y transversal.

**Unidad de análisis.** Extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

El flujograma del proceso de investigación se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Flujograma de la investigación

#### **4.3. Colecta del material biológico**

La especie vegetal se colectó en el zócalo continental de la Isla Lobos de Tierra. Su ubicación geográfica está en las coordenadas 6° 26' 0" sur y 80° 51' 30" oeste. Se ubica frente a Puerto Etén, Lambayeque, a 32 millas de la costa y su accidentado territorio está lleno de farallones. Alrededor de Lobos de Tierra hay varios islotes como El León o Albatros. (INEI, 2008)

#### **4.4. Clasificación taxonómica**

Su clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de clasificación de Guiry dada en 2017.

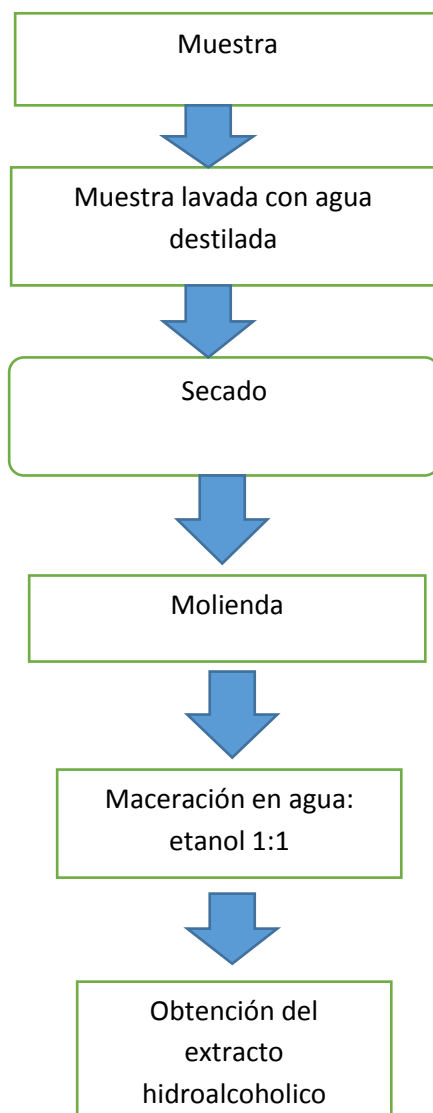
#### **4.5. Tratamiento de la muestra**

Las algas fueron lavadas con agua de mar y posteriormente con agua potable; dividiéndose en sus partes (rizoide, estípites, fronda) procediéndose después al secado, molienda y tamizado. El extracto hidroalcohólico de estas tres partes se realizara por separado.

En el laboratorio de Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.; se procedió a lavarlas con agua destilada y al secado, en principio al medio ambiente y luego en estufa a 37°C; una vez la muestra seca se realizó la molienda utilizando el mortero y pilón de porcelana; hasta obtener polvo de alga de cada una de las partes.

#### **4.6. Preparación de los extractos**

Se realizó la maceración hidroalcohólica (Etanol al 50%) en proporción 1:1 del rizoide, estípites y fronda durante una semana; para posteriormente proceder a obtener el extracto de cada una de las partes; se separó el residuo y se evaporó el solvente para obtener el extracto hidroalcohólico concentrado (50%); secándolo el residuo 40°C; (Figura 4).



**Figura 4.** Flujograma de la obtención del extracto hidroalcohólico

#### **4.7. Marcha fitoquímica**

Se realizó la marcha fotoquímica de las tres partes de la macroalga (fronda, estípite y fronda) en relación a los metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos; alcaloides), empleando reactivos de coloración y precipitación (Lock, 1994).

#### **4.8. Determinación de polifenoles totales. Método de Folin-Ciocalteu**

La medida del contenido de fenoles totales se realiza utilizando el método de Folin– Ciocalteu (Singleton, y col., 1999), que determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo(VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro.

#### **4.9. Determinación de la actividad antioxidante**

##### **4.9.1. Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

El método desarrollado por Brand-Williams et al.(1995), DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm (Ramos, 2008).

##### **4.9.2. Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín) -6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)**

El radical ABTS<sup>•+</sup> se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68V), pudiendo reaccionar con el radical, muchos compuestos fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados que pueden interferir en los resultados finales, lo cual, es un inconveniente (Agudo, 2010).

#### **4.10. Determinación de la actividad antielastasa**

Se realizó según el método de Thing, y que se describe en la tabla 4.

**Tabla 4.** Procedimiento para la determinación de la actividad antielastasa del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe

|                            | Tubo muestra problema (μL) | Tubo control (μL) | Tubo blanco de muestra (μL) | Tubo blanco para calibración (μL) |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Buffer THAM                | 100                        | 100               | 350                         | 350                               |
| Muestra Problema           | 50                         | -                 | 50                          | -                                 |
| Solvente de muestra        | -                          | 50                | -                           | 50                                |
| Enzima elastasa            | 100                        | 100               | -                           | -                                 |
| Incubar por 15 min. a 34°C |                            |                   |                             |                                   |
| Sustrato AAAPVN            | 250                        | 250               | -                           | -                                 |
| Incubar por 11 min. a 34°C |                            |                   |                             |                                   |
| Agua bidestilada           | -                          | -                 | 100                         | 100                               |
| Ácido fórmico 10% gota     | 1                          | 1                 | -                           | -                                 |
| Leer a 410 nm              |                            |                   |                             |                                   |

(Thring, 2009)

#### 4.11. Determinación de la Actividad anticolagenasa

Se realizó según el método de Thing, y que se describe en la tabla N° 5.

**Tabla 5.** Determinación de la actividad anticolagenasa del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri*. M.A. Howe

|                            | Tubo muestra problema (μL) | Tubo control (μL) |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| Muestra problema           | 100                        | -                 |
| Solvente muestra problema  | -                          | 100               |
| Enzima colagenasa          | 210                        | 210               |
| Incubar por 15 min. a 37°C |                            |                   |
| Sustrato FALGPA            | 190                        | 190               |
| Incubar por 5 min. a 37°C  |                            |                   |

|                                   |  |  |
|-----------------------------------|--|--|
| <b>Ácido fórmico 10%<br/>gota</b> |  |  |
| Leer a 348 nm                     |  |  |

(Thring, 2009)

#### **4.12. Elaboración del producto dermocosmético**

Se elaboró una forma dermocosmética (Tabla 6) en donde se adicionó el extracto hidroalcohólico del rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. a diversas concentraciones. Se prepararon tres cremas con la adición del extracto a concentraciones de 1, 3 y 5% respectivamente. Además se consideró una cuarta crema a la que no se agregó extracto (Castro, 2014).

**Tabla 6.** Composición de la crema dermocosmética

| COMPONENTES         | Conc. %  |
|---------------------|----------|
| Cera Lanette SX     | 10,00    |
| Oleato de decilo    | 20,00    |
| Vaselina liquida    | 10,00    |
| Propilenglicol      | 5,00     |
| Metilparabeno       | 0,15     |
| Propilparabeno      | 0,30     |
| Extracto de rizoide | 1 – 3- 5 |
| Agua c.s.p.         | 100,00   |

#### **4.13. Actividad fotoprotectora del producto dermocosmético**

##### **Materiales**

- Crema depilatoria corporal comercial.
- Crema base.
- Cremas al 1, 3 y 5% del extracto hidroalcohólico de rizoide de *Eisenia cokeri*. M.A. Howe.
- Protector solar factor 50 comercial

- Lámparas UV.

### Material biológico

El estudio farmacológico se efectuó con 30 ratones albinos hembra *Mus musculus* cepa Blab/C53; peso promedio 25 g.

### Diseño experimental

Los ratones fueron separados en seis grupos de cinco ratones cada uno (Tabla 7).

**Tabla 7.** Distribución de las muestras para la evaluación del efecto fotoprotector

| Nº | Grupos irradiados            | Muestras | Condición evaluada |
|----|------------------------------|----------|--------------------|
| 1  | Grupo control                | 5        | Sin tratamiento    |
| 2  | Grupo con crema base         | 5        | Crema base         |
| 3  | Grupo de intervención al 1%  | 5        | Crema al 1%        |
| 4  | Grupo de intervención al 3%  | 5        | Crema al 3%        |
| 5  | Grupo de intervención al 5%  | 5        | Crema al 5%        |
| 6  | Grupo patrón crema comercial | 5        | Crema comercial    |

### Procedimiento

**Depilación:** se realizó dos días antes del ensayo la parte anterior superior del lomo de los ratones usando crema depilatoria corporal.

**Aplicación de la crema:** se aplicaron las cremas destinadas a cada uno de los grupo respectivo (excepto el grupo blanco), de manera suave extendiéndose uniformemente. Se esperó 15 minutos a partir de la última aplicación antes de prender las lámparas UV.

**Irradiación:** la irradiación fue llevada a cabo por 30 minutos y se registró el comportamiento de los roedores durante el proceso. Se repitió el proceso de irradiación cada 12 horas por siete días.

**Toma de muestras histológicas:** se realizaron cortes histológicos del lomo de cada ratón que fue expuesto a la radiación UV, de aproximadamente un cm<sup>2</sup> sin dañar la piel, y conservándolos por separado en formol neutro estabilizado. (Castro, 2014).

**Estudio histológico:** Los cortes fueron preparadas y analizadas en el departamento de Patología Clínica del Hospital Arzobispo Loayza.



## CAPÍTULO V: RESULTADOS

### 5.1. Análisis e interpretación de resultados.

#### 5.1.1. Extracción y rendimiento

**Tabla 8.** Porcentaje de rendimiento de la muestra húmeda y muestra seca

| Parte /Muestra | Peso de alga húmeda (g) | Secado al medio ambiente (g) | Extracto seco (g) | Rendimiento seca (%) | Rendimiento húmedo (%) |
|----------------|-------------------------|------------------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| Rizoide        | 441,50                  | 384,60                       | 5,30              | 1,38                 | 1,20                   |
| Estípite       | 169,00                  | 71,00                        | 8,36              | 11,77                | 4,95                   |
| Fronda         | 501,00                  | 199,90                       | 13,74             | 6,87                 | 2,74                   |

Por su gran contenido de humedad, el material recolectado, se deseco obteniéndose porcentajes de rendimiento en muestra húmeda de 1,200 para el rizoide; 4,947 y 2,743 % para el estípite y fronda respectivamente.

#### 5.1.2. Marcha fitoquímica

**Tabla 9.** Marcha fitoquímica de los extractos

| Metabolitos secundarios    | Reactivos            | Fronda | Estípite | Rizoide |
|----------------------------|----------------------|--------|----------|---------|
| Flavonoides                | Shinoda              | ++     | ++       | ++      |
| Compuestos fenólicos       | Cloruro férrico      | ++     | ++       | ++      |
| Taninos                    | Gelatina             | ++     | ++       | ++      |
| Saponinas                  | Índice afrosimétrico | ++     | ++       | ++      |
| Triterpenoides, esteroides |                      |        |          |         |
| antranas                   | Liberman Buchardat   | -      | -        | -       |
| Alcaloides                 | Wagner               | -      | -        | -       |
| Quinonas                   | Bortranger           | -      | -        | -       |

Leyenda: Moderado (++) Leve (+) Ausente (-).

De la marcha fitoquímica preliminar se identificaron en las tres partes del alga los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, saponinas.

### **5.1.3. Determinación de polifenoles totales. Método de Folin-Ciocalteu**

El contenido de polifenoles se muestra en la tabla 10.

**Tabla 10.** Contenido de polifenoles de cada una de las partes

| Muestra  | Polifenoles en muestra seca (mg ác. gálico/ g) |
|----------|--|
| Estípite | 3,11   |
| Fronda   | 0,46   |
| Rizoide  | 2,32   |

En el resultado obtenido en nuestro estudio, el estípite de *Eisenia cokeri* M.A. Howe posee la mayor cantidad de polifenoles totales expresado en 3,110 mg ácido gálico/ g de extracto de muestra, seguida del rizoide con 2,320 mg ácido gálico/g de extracto de muestra; siendo el de menor cantidad la parte fronda con 0,460 mg ácido gálico/ g de extracto de muestra.

### **5.1.4. Determinación de la actividad antioxidante**

#### **(1) Captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

La actividad antioxidante con relación a la prueba de DPPH de las muestras de rizoide, estípite y fronda respectivamente se muestran en las tablas 12, 13 y 14 que indican los resultados de las absorbancias y el IC 50 de cada una de las muestras. En la tabla 11 se muestra el porcentaje de inhibición de DPPH del estándar Trolox® y la tabla 15 un resumen de las tres partes con el estándar.

**Tabla 11.** Porcentaje de inhibición de DPPH del estándar Trolox®

| Concentración del Trolox® (µg/mL) | Inhibición (%) |
|-----------------------------------|----------------|
| 1,2                               | 11,01          |
| 3,6                               | 32,81          |
| 7,2                               | 65,04          |
| 10,0                              | 88,56          |
| IC50 = 5,6 µg/mL                  |                |

**Tabla 12.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe según el método de DPPH

| Concentración (mg/mL) | Absorbancia (promedio) | Inhibición (%) | IC 50 (µg/mL) |
|-----------------------|------------------------|----------------|---------------|
| 0                     | 0,425                  | -              | 65,974        |
| 0,025                 | 0,300                  | 29,373         |               |
| 0,050                 | 0,236                  | 44,494         |               |
| 0,075                 | 0,178                  | 58,235         |               |
| 0,100                 | 0,144                  | 66,212         |               |
| 0,132                 | 0,031                  | 92,706         |               |

**Tabla 13.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del estípite.

| Concentración del extracto (mg/mL) | Absorbancia (promedio) | Inhibición (%) | IC 50 (µg/mL) |
|------------------------------------|------------------------|----------------|---------------|
| 0,000                              | 0,475                  | -              | 248,000       |
| 0,050                              | 0,220                  | 11,055         |               |
| 0,100                              | 0,355                  | 25,144         |               |
| 0,250                              | 0,217                  | 54,291         |               |
| 0,350                              | 0,146                  | 66,240         |               |
| 0,500                              | 0,094                  | 80,131         |               |

**Tabla 14.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico de la fronda

| Concentración del extracto (mg/mL) | Absorbancia (promedio) | Inhibición (%) | IC 50 (µg/mL) |
|------------------------------------|------------------------|----------------|---------------|
| 0,000                              | 0,475                  | -              |               |
| 0,050                              | 0,422                  | 11,055         |               |
| 0,100                              | 0,355                  | 25,144         |               |
| 0,250                              | 0,217                  | 54,291         | 280,000       |
| 0,500                              | 0,094                  | 80,131         |               |
| 0,550                              | 0,036                  | 92,415         |               |

**Tabla 15** Concentracion Inhibitoria 50 de los extractos hidroalcohólicos de las tres partes, rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe con relacion al estándar de referencia Trolox® según el método de DPPH

| Parte /Muestra | IC 50 (µg/mL) |
|----------------|---------------|
| Rizoide        | 65,97         |
| Estípite       | 248,00        |
| Fronda         | 280,00        |
| Trolox         | 5,60          |

Según el método de DPPH el IC<sub>50</sub> (µg/mL) fue de 65,97 para el rizoide; 280,00 para la fronda y 248,00 µg/mL para el estípite respectivamente. El ensayo de DPPH presento un IC<sub>50</sub> (µg/mL) de 5.6 µg/mL para el patrón Trolox®.

## (2) Captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín) -6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup> )

Los resultados de la prueba de ABTS<sup>•+</sup> se representan en las tablas 17; 18 y 19; con relación a las muestras del extracto hidroalcoholico de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. En la tabla 16 se

indica el porcentaje de inhibición de ABTS del estándar Trolox® y en la tabla 20 el resumen y comparación de las partes con el estándar.

**Tabla 16.** Porcentaje de inhibición de ABTS del estándar Trolox®

| Concentración del Trolox® ( µg/mL) | Inhibición (%) |
|------------------------------------|----------------|
| 0                                  | 0              |
| 1,2                                | 12,14          |
| 3,6                                | 19,20          |
| 7,2                                | 24,78          |
| 10                                 | 34,23          |

IC50 = 17,04 µg/mL

**Tabla 17.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del rizoide

| Concentración del extracto (mg/mL) | Absorbancia (promedio) | Inhibición (%) | IC 50 (µg/mL) |
|------------------------------------|------------------------|----------------|---------------|
| 0,000                              | 0,687                  | -              | 20,30         |
| 0,010                              | 0,603                  | 29,506         |               |
| 0,015                              | 0,528                  | 36,518         |               |
| 0,020                              | 0,415                  | 48,268         |               |
| 0,030                              | 0,272                  | 73,058         |               |
| 0,040                              | 0,137                  | 96,612         |               |

**Tabla 18.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico del estípide

| Concentración (mg/mL) | Absorbancia (promedio) | Inhibición (%) | IC 50 (µg/mL) |
|-----------------------|------------------------|----------------|---------------|
| 0,000                 | 0,687                  | -              | 24,70         |
| 0,005                 | 0,603                  | 12,160         |               |
| 0,010                 | 0,528                  | 23,092         |               |
| 0,020                 | 0,415                  | 39,505         |               |
| 0,030                 | 0,272                  | 60,367         |               |
| 0,040                 | 0,137                  | 80,014         |               |

**Tabla 19.** Absorbancia según concentraciones del extracto hidroalcohólico de la fronda

| Concentración (mg/mL) | Absorbancia (promedio) | Inhibición (%) | IC 50 (µg/mL) |
|-----------------------|------------------------|----------------|---------------|
| 0                     | 0,687                  | -              |               |
| <b>0,006</b>          | 0,623                  | 7,330          |               |
| <b>0,010</b>          | 0,581                  | 13,563         | 39,20         |
| <b>0,017</b>          | 0,524                  | 21,999         |               |
| <b>0,040</b>          | 0,329                  | 51,035         |               |
| <b>0,060</b>          | 0,158                  | 76,526         |               |

**Tabla 20.** Concentracion Inhibitoria 50 de los extractos hidroalcohólicos de las tres partes, rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe con relacion al estándar de referencia Trolox® según el método de ABTS<sup>•+</sup>

| Parte /Muestra | IC 50 µg/mL |
|----------------|-------------|
| Rizoide        | 20,30       |
| Estípite       | 24,70       |
| Fronda         | 39,20       |
| Trolox         | 17,04       |

Según el método de ABTS<sup>•+</sup> el IC<sub>50</sub> (µg/mL) fue de 20,3 para rizoide; 39,2 para fronda y 24,7 µg/mL para el estípite, respectivamente. El ensayo de ABTS<sup>•+</sup> presento un IC<sub>50</sub> de 17.04 µg/mL para el patrón Trolox®.

#### 5.1.5. Determinación de la actividad antielastasa

De los resultados de la prueba de inhibición de la enzima elastasa se representan en las tablas 22; 23 y 24 del extracto hidroalcohólico de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. Con el patrón de referencia en la tabla 21 y el resumen de los valores hallados en la tabla 25.

**Tabla 21.** Inhibición de la actividad de la enzima elastasa: patrón de referencia galato de epigallocatequina (EGCG)

| Patrón de<br>referencia galato<br>epigallocatequina<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Promedio<br>Absorbancia<br>(nm) | Elastasa<br>(% inhibición) |
|---|---------------------------------|----------------------------|
| 0   | 0,110                           | 0,000                      |
| 5   | 0,083                           | 24,50                      |
| 10  | 0,065                           | 40,910                     |
| 15  | 0,043                           | 60,910                     |
| IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )= 12,126   |                                 |                            |

**Tabla 22.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico del rizoide de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

| Sustancia<br>antienzimática<br>extracto rizoide<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Promedio<br>Absorbancia<br>( nm) | Inhibición de Elastasa<br>(% ) |
|---|----------------------------------|--------------------------------|
| 0   | 0,2812                           | 0,0000                         |
| 7,50  | 0,1351                           | 51,9559                        |
| 8,50  | 0,0914                           | 67,4964                        |
| 9,70  | 0,0781                           | 72,2262                        |
| IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) = 6,700                                       |                                  |                                |

**Tabla 23.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico del estípite de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

| Sustancia<br>antienzimática<br>extracto estípite<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Promedio<br>absorbancia<br>(nm) | Inhibición de elastasa<br>(%) |
|--|---------------------------------|-------------------------------|
| 0,000  | 0,2084                          | 0,0000                        |
| 4050,4   | 0,1021                          | 51,0076                       |
| 8100,8   | 0,0408                          | 80,4223                       |
| 9118,7   | 0,0235                          | 88,7236                       |
| IC 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) = 4778,8                                      |                                 |                               |

**Tabla 24.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico de fronda.

| Sustancia<br>antienzimática<br>extracto de<br>fronda ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Promedio<br>absorbancia nm | Inhibición de elastasa<br>(%) |
|---|----------------------------|-------------------------------|
| 0,0000  | 0,1030                     | 0,0000                        |
| 1,3700  | 0,0924                     | 10,2912                       |
| 2,7400  | 0,0839                     | 18,5436                       |
| 4,1100  | 0,0792                     | 23,1068                       |
| 6,8400  | 0,0668                     | 35,1456                       |
| IC 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) = 9607   |                            |                               |



**Tabla 25.** Porcentaje de inhibición de enzima elastasa del extracto galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos de rizoide, estípite y fronda.

| Extracto | IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----------|---------------------------|
| Rizoide  | 6,70                      |
| Estípite | 47788.00                  |
| Fronda   | 9607,00                   |
| EGCG     | 12,00                     |

Con relación al porcentaje de inhibición de enzima elastasa de galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos; estos mostraron para la sustancia patrón EGCG un IC50 igual a 12  $\mu\text{g/mL}$  y para los extractos de rizoide 6,7; estípite 47 788 y fronda 9 607  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

#### **5.1.6. Determinación de la actividad anticlagenasa**

Los resultados de la prueba de inhibición de la enzima colagenasa se muestran en las tablas 27; 28 y 29; con relación a las muestras del extracto hidroalcohólico de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. En la tabla 26 se muestra el porcentaje de inhibición de EGCG y en la tabla 30 las partes con el estándar.

**Tabla 26.** Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del EGCG.

| Patrón de referencia<br>galato de<br>epigallocatequina<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbancia<br>nm | Inhibición<br>(%) |
|--|-------------------|-------------------|
| 0  | 0,828             | 0                 |
| 80   | 0,664             | 19,850            |
| 160  | 0,497             | 39,940            |
| 250  | 0,364             | 56,04             |
| IC <sub>50</sub> = 216,991 $\mu\text{g/mL}$                                    |                   |                   |

**Tabla 27.** Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de rizoide

| Sustancia<br>antienzimática<br>extracto de rizoide<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbancia<br>nm | Inhibición<br>(%) |
|--|-------------------|-------------------|
| 0,000  | 0,8250            |                   |
| 42,350   | 0,4989            | 39,5272727        |
| 84,700   | 0,2799            | 66,0727273        |
| 169,400  | 0,108             | 86,9090909        |
| IC <sub>50</sub> = 83,60 $\mu\text{g/ml}$                                  |                   |                   |

**Tabla 28.** Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de estípite

| Sustancia<br>antienzimática<br>extracto de estípite<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbancia<br>en nm | Inhibición (%) |
|---|----------------------|----------------|
| 0   | 0,825                |                |
| 60  | 0,533                | 35,394         |
| 120   | 0,269                | 67,394         |
| 240   | 0,047                | 94,303         |
| IC 50 = 106,281 $\mu\text{g/mL}$  |                      |                |

**Tabla 29.** Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de fronda de *Eisenia cokeri* M.A. Howe.

| Sustancia<br>antienzimática<br>extracto de<br>fronda<br>( $\text{mg/mL}$ ) | Absorbancia en<br>nm | Inhibición<br>(%) |
|--|----------------------|-------------------|
| 0,000  | 0,825                |                   |
| 39,992   | 0,607                | 26,339            |
| 79,840   | 0,079                | 41,890            |
| 199,600  | 0,165                | 80,000            |
| IC 50= 113,873 $\mu\text{g/mL}$  |                      |                   |

**Tabla 30.** Porcentaje de inhibición de enzima collagenasa del extracto galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri*. Howe.

| Extracto | IC50<br>(mg/mL) |
|----------|-----------------|
| Rizoide  | 83,600          |
| Estípite | 106,281         |
| Fronda   | 113,877         |
| EGCG     | 216,991         |

Con relación al porcentaje de inhibición de enzima collagenasa de galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos; estos mostraron los siguientes datos; para el rizoide 83,60; estípite 106,281 y para fronda 113,87  $\mu\text{g/mL}$ ; siendo para el EGCG 216,991  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **5.1.7. Elaboración de la crema dermocosmética**

A partir de la fórmula utilizada se preparó una crema de tipo agua en aceite (w/o) con los siguientes resultados en el análisis organoléptico:

Crema base: aspecto: suave al tacto, fluido, ligeramente oleoso (tolerable), de color blanco.

Crema con 1% del extracto: aspecto: oleoso, suave al tacto, de color blanquecino con cierta opacidad correspondiente al extracto, Característica homogéneo.

Crema con 3% del extracto: aspecto: oleoso, suave al tacto, de color opaco, de color marrón suave.

Crema con 5% del extracto: aspecto: oleoso; suave al tacto, de color muy opaco por la concentración; color marrón oscuro.

#### **5.1.8. Actividad fotoprotectora del producto dermocosmético**

El análisis histopatológico del efecto fotoprotector, se realizó con el estudio de la piel del lomo antero-superior del ratón, al que se le realizó la aplicación tópica del extracto hidroalcohólico vehiculizado en crema en concentraciones de 1, 3 y 5% del extracto del rizoide, que es el que mostró mejores resultados en los ensayos de anticollagenasa y antielastasa. La observación de los cortes histológicos de los grupos control, patrón, los grupos de intervención se presentan en la figuras de los Anexo 5 al Anexo 11.

**Tabla 31.** Efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de estípite de *Eisenia cokeri*. M.A. Howe, vehiculizado en una forma dermocosmética sobre la piel depilada de *Mus musculus* hembra irradiado con luz UVB cada 12 horas durante 7 días.

| Después de siete días   |  |  |
|---|--|--|
| Número de Grupo   | Análisis macroscópico  | Análisis microscópico  |
| 1: grupo control irradiado  | Piel deshidratada, arrugada, áspera, congestionada, engrosamiento epidérmico | Pérdida de la capa córnea, edema superficial, erosión y reacción inflamatoria, destrucción y desorganización de las fibras colágenas, alteración de las fibras elásticas.                        |
| 2: grupo con crema base irradiado                                 | Piel deshidratada, arrugada, áspera, congestionada, engrosamiento epidérmico | Pérdida de la capa córnea, formación de ampollas, edema superficial, erosión y reacción inflamatoria, destrucción y desorganización de las fibras colágenas, alteración de las fibras elásticas. |
| 3: grupo de intervención irradiado y con crema al 1% del extracto | Piel áspera, ligeramente arrugada  | Perdida de capa córnea; leve discontinúa y casi nula. Ampollas en la epidermis y la capa muscular, abundancia de tejido colágeno.  |
| 4: grupo de intervención irradiado y con crema al 3% del extracto | Piel áspera, ligeramente arrugada  | Capa córnea leve discontinúa. Microampollas en la epidermis y la capa muscular, abundancia de tejido colágeno.   |
| 5: grupo de intervención irradiado y con crema al 5% del extracto | Piel áspera, ligeramente arrugada  | Presencia de capa córnea laminar y fragmentada. Microampollas en la epidermis y la capa muscular, abundancia de tejido colágeno.   |
| 6: grupo de intervención irradiado con crema comercial            | Piel áspera, ligeramente arrugada  | Presencia de capa córnea ligeramente continua. Microampollas en la dermis, abundancia de tejido colágeno.  |

## CAPITULO VI. DISCUSIÓN

Las algas pardas son un grupo de especies que contienen polifenoles y actúan como antioxidantes activos que son compuestos abundantes en tejidos vegetales. Estos antioxidantes corresponden a un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos, sustituidos por funciones hidroxílicas (Ortiz, 2012).

Las algas marinas son una fuente importante de compuestos antioxidantes (fenoles y polifenoles), generados como mecanismos de defensa frente a factores de estrés (radiación UV, temperatura, herbívora) (Copia, 2012).

Por su gran contenido de humedad, el material recolectado, se deseco obteniéndose porcentajes de rendimiento en muestra húmeda de 1,200 para el rizoide; 4,947 y 2,743 % para el estípite y fronda respectivamente.

De la marcha fitoquímica preliminar se identificaron en las tres partes de la alga los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, chalconas, antrona, catequinas, compuestos fenólicos, taninos, saponinas, triterpenoides, esteroides.

Los polifenoles forman parte de la dieta humana, son estructuras orgánicas con múltiples unidades estructurales de fenol; las características químicas y en número de estas unidades permiten diferenciar las variadas acciones biológicas de estos compuestos.

En el resultado obtenido en nuestro estudio, el estípite de *Eisenia cokeri* var. *M.A. Howe* posee la mayor cantidad de polifenoles totales expresado en 3,110 mg ácido gálico/ g de extracto de muestra, seguida del rizoide con 2,320 mg ácido gálico/g de extracto de muestra; siendo el de menor cantidad la parte fronda con 0,460 mg ácido gálico/ g de extracto de muestra. Especímenes de otras algas como *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile* poseen 74,25 mg/ g de alga seca; y 66,72 mg/g alga seca, respectivamente (Vidal, 2009).

Otros estudios de algas como *Lessonia nigrescens* Bory, la cantidad bajo este mismo método es de 0,629 mg/g para el rizoide; 0,454 mg/g para el estípite y 0,604 mg/g de alga seca para la fronda (Giurfa & Oblitas, 2017).

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante se utilizaron los métodos *in vitro* DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, nos proporcionan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Castañeda, 2008).

Según el método de DPPH el IC<sub>50</sub> (μg/mL) fue de 65,974 para el rizoide; 280,00 para la fronda y 248,00 μg/mL para el estípite respectivamente. El ensayo de DPPH presento un IC<sub>50</sub> (μg/mL) de 5.6 μg/mL para el patrón Trolox<sup>®</sup>.

Según el método de ABTS<sup>•+</sup> el IC<sub>50</sub> (μg/mL) fue de 20,3 para rizoide; 39,2 para fronda y 24,7 μg/mL para el estípite, respectivamente. El ensayo de ABTS<sup>•+</sup> presento un IC<sub>50</sub> de 17.04 μg/mL para el patrón Trolox<sup>®</sup>.

En las tablas 11 al 20 se puede observar que el extracto hidroalcoholico de *Eisenia cokeri* var. *M.A. Howe* posee buena actividad antioxidante y que de los tres es el extracto de estípite el que destaca en los ensayos de DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, comparado con el control positivo; estos resultados concuerdan con el ensayo de polifenoles totales.

Se observó también que mediante el ensayo ABTS<sup>•+</sup> se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante mucho más altos que por medio del método de DPPH<sup>•</sup> lo cual concuerda con datos reportados por Floegel, *et al.*, en 2011. Hay algunas razones por medio de las cuales se podría dar explicación a este hecho, la primera se basa en la longitud de onda a la cual se realizaron las medidas para cada ensayo. Para en el ensayo ABTS<sup>•+</sup> se tomó una longitud de onda de 732 nm, mientras que, para el ensayo DPPH<sup>•</sup> se midió a 517 nm. Desde la región del visible hay interferencias en la medición de compuestos coloreados como antocianinas y carotenoides que estén presentes en los extractos

evaluados a 517 nm (Beserra, y col., 2011). Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH• con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir, un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH• está impedido estéricamente (Beserra y col., 2011). Por último, esta diferencia podría estar basada en la reacción reversible del radical DPPH• con fenoles como eugenol y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante (Brand- Willians y col., 1997). (Tovar, 2013). En el método de ABTS<sup>•+</sup> presenta importantes ventajas; muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica (Kuskuski, 2005).

Existen diferencias entre los resultados aquí obtenidos con otros estudios. Esto podría deberse a diversos factores que influyen en la producción y productividad, ya que se ha descrito que la capacidad antioxidante en un alimento vegetal no proviene sólo de la suma de las capacidades antioxidantes de sus componentes, sino que el microambiente en el que se haya, influiría sobre dichos componentes para que interactúen entre sí produciendo efectos sinérgicos (Muñoz, 2007). Sin embargo, hay que considerar presencia de metabolitos antioxidantes, como fenoles y flavonoides, cuyo contenido puede ser influenciado por la altitud y la radiación de la región de origen (Fukumoto, 2000).

La capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M. A. Howe *in vitro* DPPH y ABTS<sup>•+</sup>; podría ser aplicable en formulaciones dermocosméticas (Bravo, 2005).

No se reportan otros ensayos afines para alga *Eisenia cokeri*; pero existen investigaciones sobre la actividad antioxidante de otro tipo de algas. Por ejemplo en el estudio de las algas *Cystoseira indica* y *Cystoseria merica* se determinó la actividad antioxidante por el método



de captación del radical DPPH, obteniéndose el resultado un IC<sub>50</sub> de 45 µg/mL y 67 µg/mL. (Yegdanenh, 2016). Por otro lado, en un estudio del alga parda *Macrocystes integrifolia* Bory se obtuvo que el extracto hidroalcohólico de fronda presentó una actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup> con un IC<sub>50</sub>= 173,21 µg/mL. Ensayos *in vitro* de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las tres partes distintas de la alga *Macrocystes integrifolia* Bory; demuestra que existen diferencias entre ellas en la capacidad antioxidante frente al radical libre ABTS<sup>•+</sup>; sin embargo no puede descartarse su actividad antioxidante porque se trata de un extracto que puede contener una serie de metabolitos cuyas actividades pueden añadirse o inhibirse (Castro, 2014).

De acuerdo a lo anterior se propone que la actividad antioxidante estaría relacionada a la concentración de polifenoles en las especies mencionadas. Según la bibliografía consultada, la actividad antioxidante se encuentra ligada al tipo de compuesto polifenólico que predomina en la especie vegetal. Los compuestos fenólicos, de mayor peso molecular y cantidad de grupos oxhidrilos, por ejemplo los taninos, poseerían mayor capacidad antioxidante para capturar radicales libres (Paladino, 2013).

La diferencia que se puede apreciar en los resultados de la capacidad antioxidante según los métodos de DPPH y ABTS<sup>•+</sup> es dependiendo de la cinética química de las reacciones, algunos compuestos se hicieron reaccionar con el DPPH, ya que esta reacción depende de la cantidad de oxhidrilos en su molécula; se ha demostrado que algunos alcanzan su estabilidad inmediatamente y otros de manera más lenta (Brand-Williams, 1995).

Como se mencionó, se encontraron diferencias entre los dos ensayos de captura de radicales libres (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>) empleados y se dieron algunas razones que podrían explicar dichas diferencias. Además, es necesario mencionar como una posible explicación que aunque ambos

ensayos miden la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para capturar el radical libre preformado, sus condiciones de reacción y cinética son diferentes. El radical libre DPPH• es estable en su formación por fácil disolución en metanol. En contraste, el radical catión ABTS<sup>•+</sup> se crea por reacción entre el ABTS con el oxidante, persulfato de potasio, lo cual lo hace menos estable y más transitorio.

En términos de tiempo de corrida, los extractos reaccionan más lentamente con el radical DPPH• necesitando 30 minutos para alcanzar su estado estacionario lo cual lo pone en desventaja con el radical catión ABTS<sup>•+</sup>, el cual alcanza su estado estacionario muy rápidamente; por tanto, la estequiometría de las reacciones y el mecanismo de reacción son muy distintos. Otra diferencia importante entre ambos ensayos es que el ABTS<sup>•+</sup> puede ser disuelto en un medio orgánico u acuoso y en ambos puede medirse su actividad antioxidante teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra (Wojdylo et al., 2007). Contrario a esto, el DPPH• solo puede medirse en un medio orgánico, lo cual es un limitante para la interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos evaluados (Surveswaran et al., 2007) y podría ser una razón para la diferencia presentada entre el potencial de captura (Tovar, 2013).

Diversos estudios han demostrado que la piel sufre un proceso de envejecimiento debido a cambios cutáneos microscópicos y macroscópicos por la exposición del sol. Entre las causas de fotoenvejecimiento está la radiación ultravioleta (UVB) presente en la luz solar, la cual aumenta con el deterioro de la capa de ozono (Castro, 2014). Enzima elastasa es una proteasa que degrada la proteína elastina, la cual es sumamente importante para darle elasticidad a las arterias, pulmones, ligamentos y piel. La actividad de la enzima elastasa aumenta con el paso de los años, especialmente en personas mayores a 40 años de edad, lo cual conlleva a la disminución de la elasticidad de la piel y aparición de arrugas (Mori, 2002).

Las pruebas antielastasa y anticolagenasa se realizaron con la sustancia patrón galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri*. M.A. Howe. Con relación al porcentaje de inhibición de enzima elastasa de galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos; estos mostraron para la sustancia patrón EGCG un IC<sub>50</sub> igual a 0,0012 mg/mL y para los extractos de rizoide 0,0067; estípite 47,788 y fronda 9,607 mg/mL respectivamente.

Con relación al porcentaje de inhibición de enzima colagenasa de galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcohólicos; estos mostraron los siguientes datos; para el rizoide 83,60; estípite 106,281 y para fronda 113,87 µg/mL; siendo para el EGCG 216,991 µg/mL.

Estudios realizados sobre extractos de algas marinas con actividad antioxidante y reorganizadora de fibra colágena concluyeron que presentaban actividad antifotoenvejecimiento y propusieron el mejor de ellos para su uso en la preparación de crema útiles contra las arrugas de la piel (Concepción, 2001).

El 80% del peso seco de la piel está constituido por la proteína colágeno, la cual es responsable del tono de la piel. La enzima colagenasa se encarga de romper los enlaces peptídicos del colágeno y se estima que sustancias que inhiban dicha enzima podrían ser usados como agentes preventivos de la aparición de arrugas (Thring, 2009).

Se ha reportado estudios sobre la actividad de diversos extractos de plantas y aceites esenciales con actividad anticolagenasa y antielastasa, aunque hasta el momento ninguno de ellos fue realizado con plantas peruanas. Se ha encontrado en un trabajo de investigación se encontró que tanto la tara como el camu camu no poseen actividad antielastasa *in vitro*; sin embargo, el extracto de tara sí mostró una buena actividad anticolagenasa, inclusive mayor que la del control positivo EGCG; EC<sub>50</sub> = 162,78 y 321,41 µg/mL, respectivamente (Doroteo, 2012).

Se demostró que todos los valores obtenidos en las pruebas, según el análisis estadístico de ANOVA, presentan un  $p < 0.05$ ; por lo que se acepta que las diferentes concentraciones del extracto del alga poseen estadísticamente diferencias significativas entre sí. La radiación ultravioleta puede causar respuesta inflamatoria de la piel, daño del ADN, fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis; por lo que en los últimos años se ha venido incrementando el uso de extractos de plantas que puedan contrarrestar los efectos dañinos de esta radiación, cuya actividad se debería principalmente a su propiedad antiinflamatoria y antioxidante (Bae, 2010).

Estudios realizados sobre extractos de algas marinas con actividad antioxidante y reorganizadora de la fibra colágena, concluyeron que presentaban actividad antifotoenvejecimiento y propusieron para su uso en la preparación de cremas útiles contra las arrugas. (Concepcion, 2001). En este sentido se ha evaluado el efecto de los diversos compuestos, muchos de origen marino, pues la protección de estos organismos a la luz UV incluye sustancias que absorben estas radiaciones. (Dunlap, 1998).

Conforme a ciertos estudios algunos compuestos fenólicos tienen la capacidad de formar precipitados con iones metálicos como el zinc; el cual es un componente del centro activo de la colagenasa. Se ha reportado que los taninos poseen actividad quelante por lo cual al formarse un precipitado con el zinc se impide la unión de la enzima colagenasa con el sustrato. (Kim, 2004). Teniendo en cuenta el resultado de la marcha fitoquímica realizada a los extractos de estípita, fronda y rizoide que el bajo potencial de actividad enzimática es debido a la poca presencia de taninos, pero se debería realizar un análisis más exhaustivo.

En los últimos años se ha despertado en la población un gran interés por usar productos naturales botánicos para prevenir el daño inducido por la radiación UV. En tal sentido, las plantas más promisorias para prevenir

los daños causados por la radiación solar son aquellas que posean actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y antioxidante (Saraf, 2010).

Muchos autores coinciden en que los extractos de plantas y las sustancias naturales aisladas de estas podrían ser usados como ingredientes para bloqueadores solares debido a sus propiedades antioxidantes y a su capacidad de absorber la luz ultravioleta. En un estudio a los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales peruanas, uno de las vainas de la tara que a bajas dosis posee muy buena actividad antioxidante *in vitro* y otro a partir de los frutos maduros del Camu Camu, capaz de inhibir el efecto dañino de la radiación ultravioleta sobre los fibroblastos. Se recomienda investigar si la asociación de ambos extractos actuaría en forma sinérgica, con miras a desarrollar un bloqueador solar natural con mecanismo de acción dual (Doroteo, 2012).

De acuerdo a los resultados macroscópicos de la piel de los ratones, después de siete días de irradiación se pudo observar que todos los grupos irradiados mostraron un notable deshidratación y piel arrugada. Existen estudios similares con los mismos resultados. La exposición a la radiación UV resulta en lesiones en la piel como hiperpigmentación, arrugas, envejecimiento, daño por acción de la luz, etc. (Roy, 2013). El déficit de agua va dando a la piel una apariencia seca, arrugada y escamosa (Honeyman, 2002).

Se realizaron las pruebas del efecto fotoprotector del extracto de rizoide, pues este presenta las mejores condiciones tanto en contenido de polifenoles, efecto antioxidante, antielastasa y anticolagenasa. Se prepararon cremas con extractos al 1, 3 y 5% del extracto en la crema detallada en la metodología.

En los resultados histológicos se puede apreciar en la tabla 31, que el grupo 5, nuestro grupo de intervención al 5 % del extracto

hidroalcohólico del rizoide se acerca a las características de uso de la crema comercial.

## CAPITULO VII: CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico del rizoide al 5% de *Eisenia cokeri* M.A. Howe contenido en una crema dermocosmética tiene un efecto fotoprotector *in vivo* contra la radiación UV sobre la piel.
- El contenido de polifenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu; demostró mayor cantidad en el estípite de *Eisenia cokeri* var. *M.A. Howe*; siendo el resultado de 3,13460 mg de ácido gálico por g de muestra seca; mientras que para el rizoide 2,31665 y 0.46250 µg/mL para la fronda.
- La determinación de la actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, demostraron que los extractos hidroalcohólicos poseen buena actividad antioxidante siendo comparada con el estándar de referencia Trolox<sup>®</sup>.
- Con relación al porcentaje de inhibición de enzima elastasa del extracto galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcoholicos de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri*. Howe; estos mostraron para la sustancia patrón un IC50 igual a 12.126 µg/mL y para los extractos de rizoide 6.700; estípite 47,788 y fronda 9,607 µg/mL respectivamente. Con relación al porcentaje de inhibición de enzima collagenasa del extracto galato de epigallocatequina (EGCG) y de los extractos hidroalcoholicos de rizoide, estípite y fronda de *Eisenia cokeri*. Howe; estos mostraron los siguientes datos; para el Rizoide 83,60 µg/mL; Estípite 106,281 µg/mL y para Fronda 113,87 µg/mL; siendo para el EGCG 216,991 µg/mL.
- El grupo de intervención con el 5% del extracto hidroalcoholico del estípite tuvo resultados similares al de la crema comercial factor 50.

## CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Abdala-Díaz, R.T., Cabello-Pasini, A., Márquez-Garrido, E., & López Figueroa F. (2014). Variación intratalo de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad de la fenolsulfatasa en *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) del sur de España. *Ciencias marinas*, 40(1), 01-09.  
<https://dx.doi.org/10.7773/cm.v40i1.2350>
- Acleto, C. (1986). *Algas Marinas del Perú de Importancia Económica. Serie de Divulgacion N° 5.* Departamento de Botánica. Museo de Historia Natural "Javier Prado". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Peru. p 98-100.
- Agudo (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Autodidacta. Rev. Edu. Extrem.* ISSN: 1989-9041.
- Arber, A. (1987) . *Herbals. Their Origin and Evolution. A Chapter in the History of Botany 1470-1670.* Cambridge University Press, New York., 358 p.
- Alvitez Izquierdo. (2007). *Diversidad, Taxonomía y Ecología del Litoral Peruano.* Revista REIBOL. Trujillo , Peru . UNT Reibol. Vol 25. p 15.
- Asociación Argentina de Alergia e Inmunología. (2002). Pagina Web en línea. Recuperada el 4 de mayo de 2008 en: [http://cordobalergia.com/mm/doc/revistas/alergia\\_suplem.2002.pdf](http://cordobalergia.com/mm/doc/revistas/alergia_suplem.2002.pdf)
- Bae, J-Y., Choi, J-S., Kang, S-W., Lee, Y-J., Park, J., Kang, Y-H. (2010) Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp. Dermatol.* 2010; 19, e182.
- Bafna, A., Mishra, S, (2010), *Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de Curculigo orchoides Gaertn* . Revista del Departamento de Farmacia, Facultad de Tecnología e Ingeniería, The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002, Gujarat, India. p 125.
- Batista, A., Charles, M., Mancini-Filho, J.; Vidal, A. (2009). *Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes.* Revista Cubana de Plantas Medicinales, v.14 , n.2.
- Barja, G. (2014) *Radicals libres y antioxidants.* En: cascales M. Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativa. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia. Versión impresa
- Brand- Williams, W., (1995) *Use of radical method to evaluate antioxidant activity* . Food Science and Technology; 1995: 25 (I): 25-30

Bravo, R. & Pérez, S. (2005). *Factibilidad de desarrollar un producto cosmético empleando como principio activo el aceite extraído de una semilla vegetal*. Trabajo Especial de Grado no publicado. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de Carabobo. pp. 45-91.

Castañeda, C.; Ramos, L.I.; Ibañez, V.; (2008) *Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Siete Plantas Medicinales Peruanas*. Revista Horizonte Médico. Volumen 8, 2008; p. 56-72.

Castellanos, G; Alcala, D (2010) Antioxidantes en Dermatología; Revista Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica; Vol 8(4):p. 272-277.

Castro, A.; Juarez, J.; Alcarráz, M.; Suárez, S y col. ; (2014) Efecto antioxidante y antifotoenvejecimiento de los extractos de la macroalga del litoral peruano *Macrocystis integrifolia* Bory y elaboración de una forma dermocosmética. Ciencia e Investigación 2014; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2014; 17 (2) p. 80-87

Clesceri, L.S; (2001) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 17 Edition. Method 5550 tannin and Lignin. Port City Press Baltimore,

Comisión Europea de Cosméticos (2006). Página web en línea. Recuperada el 5 de marzo de 2008 en: <http://europa.eu.int>.

Concepción, A.; Fernandez, M.; Fernandez, A; Mata, A (2001). Evaluación de extractos de algas marinas, con actividad antioxidante y reorganizadora de la fibra colágena. Revista Cubana de Investigación Biomed, 2001; 20 (1) pag. 6-11.

Copia, J., Gaete, H, Zúñiga, G; Hidalgo, M.; Cabrera, E.; (2012) Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp. Lat. Am. J. Aquat. Res., 40(1): 113-123, 2012 [doi: 10.3856/vol40-issue1-fulltext-11](https://doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-11)

Chanchal, D., Swarnlata, S. (2009) Herbal photoprotective formulations and their evaluation. Open Nat. Prod. J. 2009; 2, 71.

Doroteo, V.; Terry, C.; Diaz, C.; Vaisberg, A; Rojas, R. (2012) *Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante, antielastasa, anticolesterol y fotoprotectora in vitro de Myrciaria dubia (camu camu) y Caesalpinia spinosa (tara)*, Lima, Rev. Soc. Quím. Perú v.78 n.4 Lima oct./dic. 2012



Dunlap, WC; Chalker, BE; Bandaranayake, WH; Won, J; (2008) Nature's sunscreen from the Great Barrier Reef, Australia, *Int. J. Cosmet Sci* 1998; 20 (1): 41-51.

Edding M (2017) Fotosíntesis, productividad y algas marinas; [https://www.researchgate.net/publication/236980779\\_Fotosintesis\\_productividad\\_y\\_algas\\_marinas](https://www.researchgate.net/publication/236980779_Fotosintesis_productividad_y_algas_marinas) [accessed May 11, 2017]. Universidad Católica del Norte, Chile.

Fukumoto L, Mazza G. (2000) *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48; 3597-3604

García, BL; Vicente, G; Rojo, DD; Sánchez GE. (2001) *Plantas con propiedades antioxidantes*. *Revista Cubana de Investigación Biomedica*; 20(3): p. 231-235.

García A; (2005) Evaluación *in vitro e in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis Doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Murcia.

Giurfa, G.; Oblitas, J., (2017) "*Polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, efecto fotoprotector de Leissonia nigrescens Bory y desarrollo de una forma dermocosmética*". Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú,.

Kim, Y.; Uyama, H.; Kobayashi, S. (2004). Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 258-61.

Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., Szeimies, R. (2011). Skin ageing. *J EADV* 2011; 25: 873-84

Kuklinski C. (2003) *Farmacognosia*. Ediciones Omega S.A. Barcelona.

Kuskuski EM, Asuero AG, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R, Aplicación de diversos métodos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas* 25 (4): 726-732.

Honeyman, J. (2012) Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. *Revista Peruana de Dermatología*. 2002: Vol. 12 • Nº 2

Inocente, M.A. (2014) "*Actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de camu camu (Myrciaria dubia, Kunth)*". *Revista Sociedad Química del Perú*.

INEI, (2008) “*Compendio Estadístico*”. Dirección Nacional de Censos y Encuestas. p. 25. Sistema Estadístico Nacional. INEI. Perú

Li-Alfaro, G., Zafra-Trelles, A. (2009) *Composición, abundancia y diversidad de macroalgas en el litoral de puerto Malabrigo, La Libertad - Perú 2009*. *SCIÉND*15(1):33-42.2012. Revista de la Universidad Nacional de Trujillo.

Lock de Ugaz, (1994). Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2ed. Lima – Perú. Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Lopez, F.; Aguilera, J.; De La Coba, F.; Korbee, N.; (2006) Patente de la Universidad de Málaga; Número de publicación patente: ES2317741, Universidad de Málaga, España.

Losantos, R., Funes-Ardoiz, I., Aguilera, J., Herrera-Ceballos, E., García, E; Iriepa, C., Campos, P.J., Sampedro, D, (2017) ; Rational Design and Synthesis of Efficient Sunscreens To Boost the Solar Protection Factor. a *Angewandte Chemie International Edition*, el Volume 56, Issue 10; March 1, 2017 p 2632–2635 [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1521-3773](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1521-3773) <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201611627>

Martinez, FS., Gonzales, GJ., Culebras, Jm, Tuñon, MJ.(2002) *Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Revista Nutricion Hospitalaria*; 17(6): p 271-278.

Molinero E, Guillén M. ( 2014 ) *Perfumeria y Cosmetica Natural*, A. Madrid, Vicente Ediciones. 1ª Edición.

Moon, JY., Yim, EY., Song, G., Lee, NH., Hyun, CG. (2010) *Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju island plants*. *Revista EurAsia J. BioSci*. 2010; 4: p.41-48.

Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., Watabe, K. (2002) Inhibition of elastase activity by essential oils in vitro. *J. Cosmet. Dermatol*. 2002; 1, 183.

Mujica, Viky, Delgado, Mariam, Ramírez, Maryore, Velásquez, Ingrid, Pérez, Cathy, & Rodríguez-Corella, María. (2010). *Formulación de un producto cosmético con propiedades antiarrugas a partir del aceite de semilla de merey (Anacardium Occidentale L)*. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 25(2), 119-131. Recuperado en 16 de diciembre de 2016, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-40652010000200013&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652010000200013&lng=es&tlng=es).

Muñoz, J.; Ramos, E.; Alvarado, Ortiz, U; Castañeda, C. (2007). *Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios*. Revista Sociedad Química del Perú 2007; 73 (3) : p-142 – 149.

Núñez, W.; Quispe, R, (2015) *Evaluación antioxidante y antiinflamatoria in vitro y antiinflamatoria in vivo del extracto hidroalcohólico de la Caesalpinia spinosa "tara"*: Lima, Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica; Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Ndlovu, G.; Fouche, G., Tselanyane, M.; Cordier, W.; Steenkamp, V. (2013). In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants, BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013; 13: 304-10.

Ogilvie, B. W. (2003). "The Many Books of Nature: Renaissance Naturalists and Information Overload" Journal of the History of Ideas, Vol. 64, No. 1 pp. 29-40.

Ortiz, J. (2011) *Composición Nutricional y Funcional de Algas Pardas Chilenas : Macrocystis pyrifera y Durvillaea antarctica*. Monografía de la Revista de la Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. [http: repositorio.uchile.cl/ Monografias. Algas Pardas Chilenas](http://repositorio.uchile.cl/Monografias.AlgasPardasChilenas).

Paladino, S. (2013) "Actividad Antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid Vitis vinifera". Tesis de Magister en Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.

Paredes, SF; Clemente, FA. (2005) *Polifenoles de aplicación en farmacia*. Fitoterapia; 21 (4) : p. 85-94.

Pérez, A. (2003). *Factibilidad técnico económica de una planta productora de una crema cosmética a partir del aceite de la semilla del neem (Azadirachta indica)*. Trabajo Especial de Grado no publicado. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de Carabobo. s/n.

Portocarrero, O. (2007), *Estudio de la flora actual de la cuenca baja del río Supe y sus evidencias arqueológicas en el sitio Caral*. Tesis Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima; Perú.

Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012) *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Revista de Nutrición Hospitalaria. 2012; 27(1): 76-89

Quitral, V., Morales, C., Sepúlveda, M., & Schwartz M. (2012). *Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional*. Revista chilena de nutrición, 39(4), 196-202.  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>

Ramos, E., Castañeda, B. Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas, Revista Academia Peruana de Salud, 15(1), 2008, p. 42-46

Rodriguez, J. (2014) . *Estructura química y Actividad Antioxidante in vitro del aceite esencial de Eryngium foetidum L. "Siuca culantro"*. Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Peru.

Rojas, R., Doroteo, V., Díaz, C., Vaisberg, A., Neira, M., Terry, C. (2013). *Actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, protectora contra rayos UV-B, promotora de síntesis de colágeno in vitro y estudios de seguridad/eficacia de extractos de Bixa orellana ("ACHIOTE") Y Oenothera rosea ("CHUPASANGRE")* . Lima, Peru . Boletín apqc, Proyecto 148-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010, 1,2.

Roy, A. et al. (2013). In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetics formulations. Pharmacognosy Revist, 2013: 7 (14) : 97-106.

Saewan, N; Jimtaisong, A. (2015) Natural products as photoprotection. J Cosmet Dermatol. 20 ( 2015) Mar;14(1):47-63. [doi: 10.1111/jocd.12123](https://doi.org/10.1111/jocd.12123).

Saraf, S., Kaur, C.D. (2010) Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. Phcog. Rev. 2010; 4, 1.

Suarez, S. (2014). Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del Allium sativum var. Huaralino (ajo) en modelos in vitro. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Peru.

Surveswaran S., Cai Y-Z., Corke H, Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry; 102: 938– 953.

Tomas-Barberán F.A. *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Revista Alimentos, Nutrición y Salud. 10(2) : 41-53.

Tovar, J (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis para optar el grado de Químico Industrial. Escuela de Tecnología Química, Universidad de Pereira ,

Thring,T; Hili, P., Naughton, D.P(2009) . *Anti-collagenase, anti-elastase antioxidant activities of 21 plants*. BMC Complement. Altern. Med. 2009, 9, 27

Valdés, O; Hernández, Y; Fernández, M; Hernández, I; Rodríguez, M; Cano, M; Laguna, A; Díaz, B y Cabrera, B; (2008) *Actividad antioxidante de algas y plantas marinas de la plataforma insular cubana*. Revista Ciencia Farmaceutica Peru.

Vasquez, J; Fonck, E. (2017) “*Estado actual y perspectivas de la explotación de algas alginofitas en Sudamérica*” Departamento de Biología Marina/Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. Coquimbo-Chile. Documento de la FAO.

Vidal, Silva de Andrade, Fallarero. (2009). *Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas halimeda opuntia y halimeda monile*. Universidad de Granada; España. ARS Pharmaceutica, ISSN.

Wojdylo A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry; 105: 940–949.

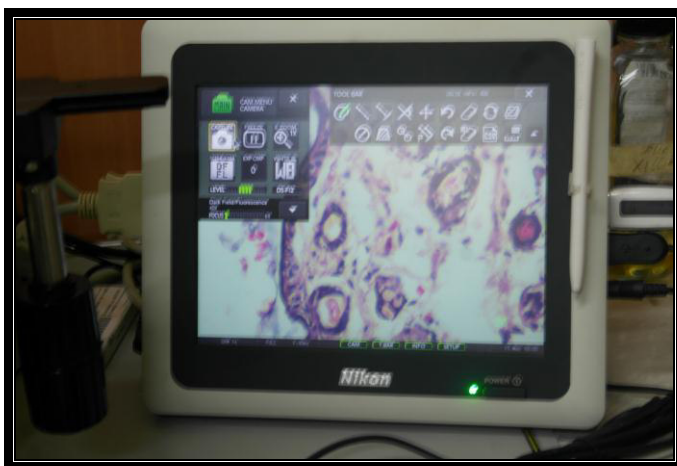
*United States Pharmacopeia*, (2016) USP – NF 35. Physical-chemical tests on dermocosmetic products.

Yegdanen, A; Ghannadi, A; Dayani, L. (2016). Chemical constituents and biological activities of two Iranian *Cystoseira* species. Res. Pharm. Sci, 2016; 11 (4) : 311-17

Zavaleta, J. *et al col.* (2005) Capacidad Antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Revista Horizonte Médico. 2005, 2(5):29-38.

## CAPITULO IX.

### ANEXO 1. Fotografía del alga y sus partes, y del microscopio electrónico.



## Anexo 2. Clasificación taxonómica (Museo de Historia Natural – Herbario San Marcos- UNMSM)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



---

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

**CONSTANCIA N° 005-USM-2017**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal recibida de **José Edwin Adalberto RODRIGUEZ LICHTENHELDT**; alumno del Doctorado de Farmacia y Bioquímica-UNMSM, ha sido estudiada y clasificada como: ***Eisenia cokeri*** M.A.Howe y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D & Guiry, G.M. 2017, Algae Base.

**DIVISION: OCHROPHYTA**

**CLASE: PHAEOPHYCEAE**

**SUBCLASE: FUCOPHYCIDAE**

**ORDEN: LAMINARIALES**

**FAMILIA: LESSONIACEAE**

**GENERO: *Eisenia***

**ESPECIE: *Eisenia cokeri* M.A.Howe**

Determinado por Blgo. Mario Benavente Palacios.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 20 de enero de 2017

  
**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**  
 JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



Ace/ddb

---

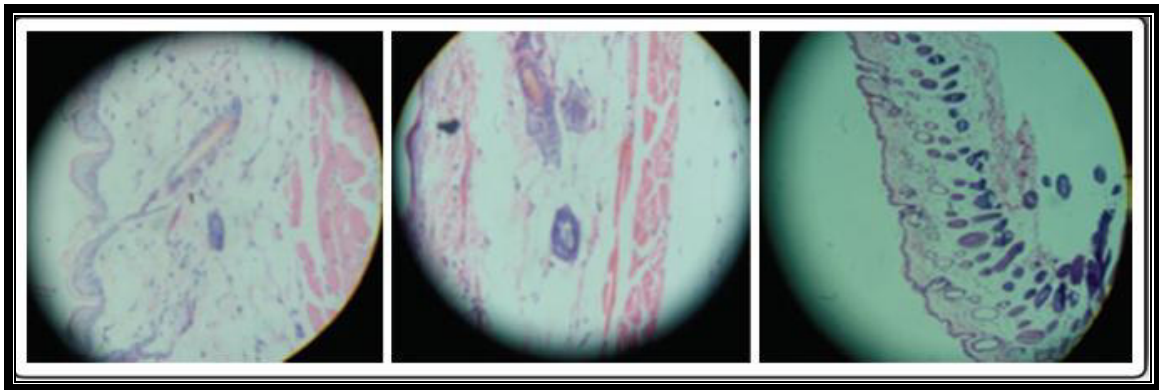
Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfonos: (511) 471-0117, 470-4471  
265-6819, 619-7000 anexo 5703

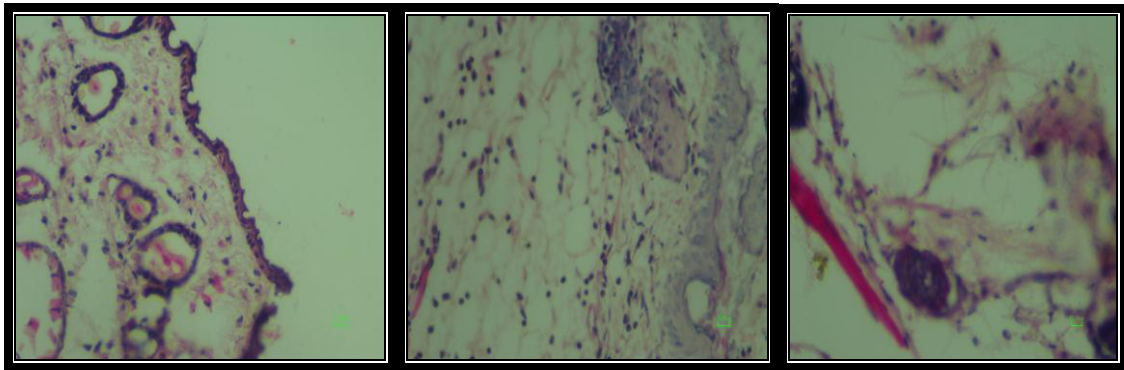
e-mail: museohn@unmsm.edu.pe  
http://museohn.unmsm.edu.pe



**Anexo 3.** Microfotografías de los cortes de piel de los ratones.

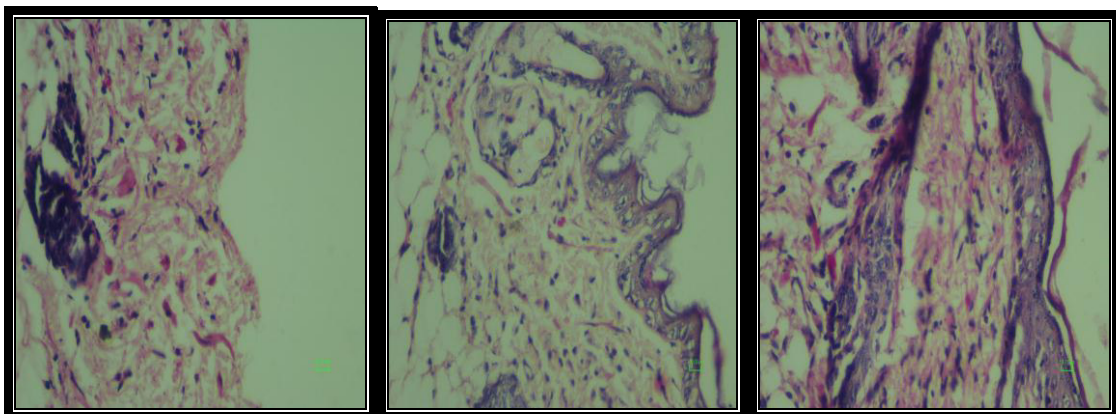


Blanco, ratones depilados sin crema y sin irradiación en Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X (tomado de Castro 2015). Análisis microscópico: Estructura conservada, dermis, epidermis y capa muscular conservada, capa córnea laminar y filamentosa, tejido colágeno laxo, fibras colágenas regulares, y presencia de folículos pilosos; macrófagos y células sebáceas normales.



Grupo control irradiado, sin crema. Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X.

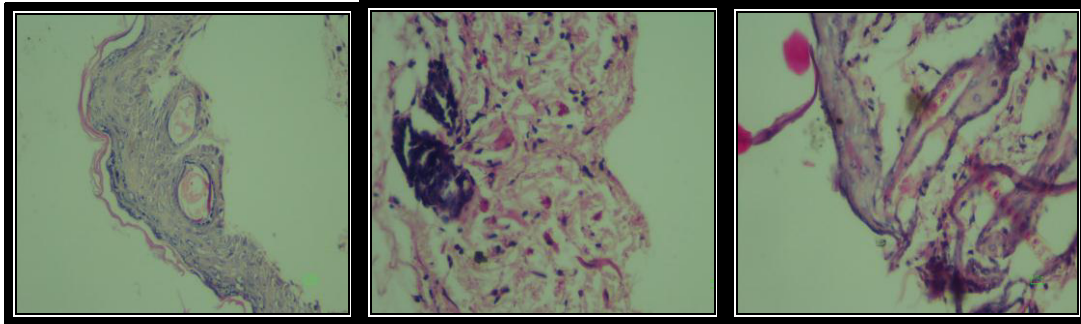
Análisis microscópico: Pérdida de la capa córnea, edema superficial, erosión y reacción inflamatoria, destrucción y desorganización de las fibras colágenas, alteración de las fibras elásticas.



Grupo irradiado con crema base en Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X

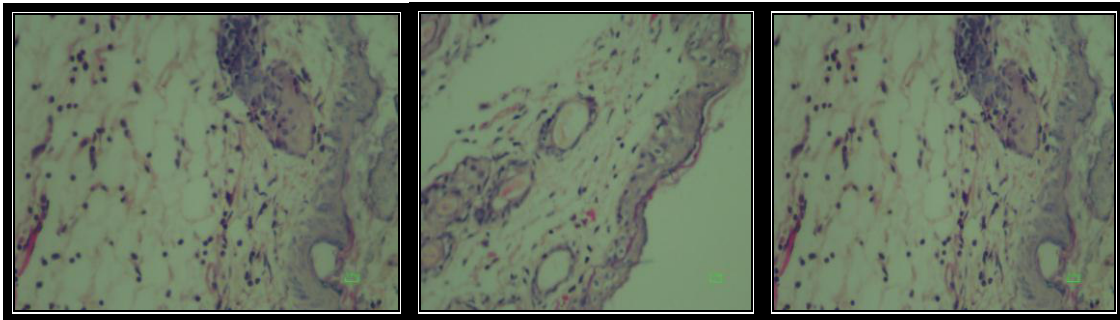
Análisis microscópico: Pérdida de la capa córnea, formación de ampollas, edema superficial, erosión y reacción inflamatoria, destrucción y desorganización de las fibras colágenas, alteración de las fibras elásticas.





Grupo irradiado con crema al 1% del extracto de rizoide irradiado en Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X.

Análisis microscópico: Pérdida de capa córnea; leve discontinúa y casi nula. Ampollas en la epidermis y la capa muscular, abundancia de tejido colágeno.



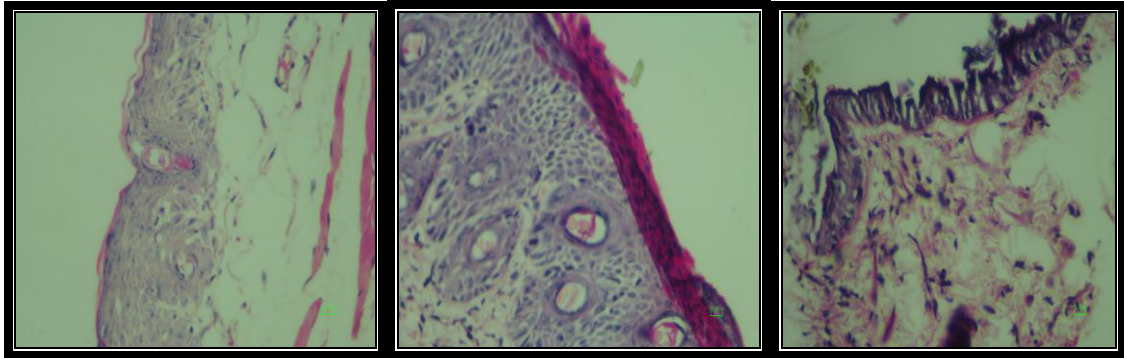
Grupo irradiado con crema al 3 % del extracto de rizoide irradiado en Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X.

Análisis microscópico: Capa córnea leve discontinúa. Microampollas en la epidermis y la capa muscular, abundancia de tejido colágeno.



Grupo irradiado con crema al 5 % del extracto de rizoide irradiado en Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X.

Análisis microscópico: Presencia de capa córnea laminar y fragmentada. Microampollas en la epidermis y la capa muscular, abundancia de tejido colágeno



Grupo irradiado con crema comercial en Hematoxilina – Eosina. Aumento 40X.

Análisis microscópico: Presencia de capa córnea ligeramente continúa. Microampollas en la dermis, abundancia de tejido colágeno.

**Anexo 4.** Informe de trabajo de investigación

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE MEDICINA 

**INFORME DEL TRABAJO DE INVESTIGACION**

Nombre de la Investigación:

"DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIELASTASA, ANTICOLAGENASA Y FORMULACION DE UN PRODUCTO DERMOCOSMETICO A PARTIR DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE EISENIA COKERI M.A. HOWE"

Tesista: Rodríguez Lichtenheldt José Edwin Adalberto

Institución o Dependencia: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Profesor responsable: Dr. Ernesto Raez González – Docente del Instituto de Patología - UNMSM

El alumno en mención ha realizado la inclusión, corte y leído las muestras correspondientes a su trabajo de investigación desarrollado en los Laboratorios del Instituto de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, desde el mes de abril hasta la fecha,

Docente que expide para los fines convenientes.

Lima, 17 de Mayo 2017

  
Dr. Ernesto Raez González  
Responsable

